

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA III

---



\* 5 3 0 9 6 5 6 3 1 9 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ESTUDIO DE LA REPRESION CATABOLICA POR GLUCOSA EN  
*Candida utilis*

Vº Bº El director  
José Martínez Peinado

El doctorando



Archivo

Tesis Doctoral  
Alberto Eugenio Espinel González  
1996

21.170

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

---

ESTUDIO DE LA REPRESIÓN CATABÓLICA POR GLUCOSA EN  
*Candida utilis*

Tesis Doctoral  
Madrid, 1996

Porque crió Dios arquitecto y perfectísimo todas las criaturas en justos peso y medida y consta la hermosura sensible de conveniencia, concordia y proporción de las partes con el todo y de ellas entre sí, haciendo inferir es hermoso el mundo y creer tienen sus cosas tan cierta y determinada magnitud que si de esta máquina se quitase una estrella o parte o se añadiese se deformaría el compuesto y belleza, porque se hizo con acuerdo en el número y peso que acordó el fabricante y en la proporción que tenía en su divina raza.

Luis Cabrera de Córdoba  
Historia de Felipe II, Rey de España. Madrid (1619)

## Agradecimientos

---

Gracias al Prof. José Martínez Peinado, Director del Departamento de Microbiología III, por dirigir esta Tesis.

Gracias también al Prof. Karel van Dam por permitirme una estancia en su laboratorio del Instituto E.C. Slater de la Universidad de Amsterdam.

Estoy agradecido al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme una beca predoctoral (convocatoria de 1991, Programa de Formación de Profesorado Universitario) y a la DGICYT, porque la financiación que ha sustentado el trabajo experimental de esta Tesis ha sido a cargo del proyecto PB91-919-C02-02.

De la misma manera, tengo que agradecer al Servicio de Investigación y Relaciones Internacionales de la Universidad Complutense de Madrid la concesión de una beca para una estancia corta en Holanda.

Tengo que estar públicamente muy agradecido a las personas del Departamento de Microbiología III (somos La 11), porque me ofrecieron su colaboración y ayuda siempre que así lo precisé. Pero especialmente quiero señalar a las personas del Labo 8 (la mitad del Grupo "**Pon una levadura en tu vida-Get a yeast in your Life**"). A lo largo del tiempo que ha durado la Tesis ha habido altas y bajas (o altos y bajos, porque somos mayoría los varones), pero ha existido un núcleo duro:

Javier (en lituano *Javieras*) con el que he recorrido la mitad de Europa de golpe de Congresos. Los dos estamos de acuerdo en que alguien obligue a los bares para que ofrezcan una tapa siempre que se haga una consumición y que se conserve el Madrid canalla, pero sin canallas. Además hemos discutido los problemas de trabajo, a pesar de que cambió la *Candida* por otra (levadura). Muchas gracias, *chavá*.

Manolo (*Manué*), nuestro hombre en el Tiemblo y experto en asuntos de farándula. Muchasgraciasportodo (esta es una frase correcta, al menos tal como habla Manolo).

Belén (*Belenius*), nuestra hada madrina con el café y martillo de atléticos. Sin ella, los colchoneros me habrían comido. Junto con Patricia, sabían las noticias antes de que realmente ocurriesen.

María José (*María Hozé* o Sra. Mac Carthy y, próximamente *María Hozé & Son or Daughter*), aunque se sienta más identificada con la otra carrera que cursó que con Biología.

Begoña (*Seño*). Gracias por aguantar sin demudar la faz cuando nos empeñábamos en mostrar que la música, además de ser una de las Bellas Artes, tiene un montón de decibelios. Siempre la consideraremos miembro del Labo 8, aunque ahora esté en otro despacho en comisión de servicios (no aceptamos otra explicación).

Covadonga (*Cova*). No es del Labo 8, hemos sido nosotros los que hemos invadido el suyo para trabajar (¿vas a medir mucho..?) y para tomar café. Si yo fuera ella, hubiera denunciado el hecho a quien correspondiera.

Victor (*Vittorio*), importado y exportado. Vino con fiebre de conocer y se irá con la fuerza de quien quiere comerse el mundo. No entiendo por qué. Cualquiera perdería la moral si hubiera tenido que sufrir las torpezas de la nulidad humana que le asignaron (al que aquí llamaremos Alberto; mantengamos su identidad en el anonimato) para que le mostrara que el material fungible es más perecedero de lo previsto y que los resultados que se ajustan a lo lógico han de enmarcarse en la pared. Además, ha soportado mis intentos de probar la Teoría de la Tectónica de Placas mientras amontonaba mis papeles en su



mesa.

También han estado Miguel y Eva (*Miguelius* y *Sra.*), culpables de la introducción de música ilegal en el Labo. Antonio (*Lantonio1*), al que deseo que vuelva a España ASAP, como el diría. Luis (*Luisillo*) y Oscar (*Oscar* como curioso sobrenombre), tienen todo un futuro y una Tesina por delante. Consideran a Warburg como un familiar muy cercano y han demostrado que Castilla también existe a algunos excepticos del Labo. Nuria con la que pasé mis primeros tiempos aquí.

Aunque un taxónomo no los considerara *laboochoensis sensu extricto*, no puedo olvidarme de Paco (*PacoR*, con R al final), nuestro vecino y el que cargó "La Corná Digital" en nuestro pobre 486. Las chicas del 19 (*bichos*), que me han hecho pasar momentos muy divertidos en tiempos de Guerra y Paz. Gemma (*¡Numancia!*), que nadie te enquite. José Luis (*PepeLui*) -ex *Pichia stipitis*, finalmente descubrió su pasión por los protozoos- y Carmen (*Carmenchu*) que ya no se inmuta cuando dices: ¿puedo...? cuando quieres consultar el correo electrónico. La otra mitad de Grupo "Pon una levadura...": Domingo (*Domingovitch*), Antonio (*Lantonio2*), Paloma (*Palomyces*) -que hubiéramos hecho sino hubieras conservado las cepas-, Esperanza (*Marzipan*) y Salah (*Salajota*). Martha Lucia (*Marta Lusía*), según consta en su documentación, cuando no la ha perdido. Nacho (*Nachor*), o todo lo que Vd. quería saber de las plantas carnívoras y no se atreve a preguntar. Y, cómo no, al FLL.

También tengo un recuerdo de mis compañeros del Instituto E.C. Slater (*Dank je wel voor alles, guys*). No hubiera podido concluir un solo experimento sin su ayuda, pero no les perdonaré aquella noche de la masacre del Ajax en Madrid y la noche toledana en Amsterdam, por la comida mejicana. Karel (*again*), Mike (*English Mike*) and wife, Hans Peter, Bas and, of course Wilko (*who lives now in somewhere close to us*).

Aunque no sea habitual, tengo que mencionar a una máquina: el fermentador. El aspecto de las batas que he utilizado mientras trabajaba con él ha contribuido a arruinar mi reputación.

No quiero concluir sin recordar aquellos lugares y aquellas situaciones inolvidables que he vivido mientras he estado ejerciendo de becario. En estos años he descubierto la inmensidad culinaria de la *Chanfana à Salgueira* y he sabido que es posible encontrar a alguien que ha sido algo más que una amiga (*Skoll*).

Como fuera del laboratorio existe un mundo, no puedo olvidar a José Luis (¿bajas? Estoy en ca'Fernando) y monitora (M<sup>a</sup> José), Juan y Esther (y su F<sub>1</sub> que nos les deja dormir, Bea), Meri y Juanito, Esther y Gori (que boda la de aquel día). Para que veáis que soy formal os puedo prometer por escrito que es posible que me case el año que viene.

## ÍNDICE

---

Nota previa .....	
1. Introducción. ....	
1.1. Efectos de la presencia de hexosas fácilmente metabolizables en el metabolismo de los microorganismos. ....	i
1.1.1. Efectos a corto plazo en el metabolismo de levaduras. ....	i
1.1.2. Represión catabólica en microorganismos. ....	iv
1.1.2.1. Represión catabólica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .. ....	vi
1.2. Cómo afecta la represión catabólica en determinados procesos industriales con levaduras. El ejemplo de <i>Candida utilis</i> . ....	xi
1.3. Hexoquinasas en los microorganismos. ....	xvi
1.3.1. Hexoquinasas en <i>Candida utilis</i> . ....	xvi
Objetivos .....	
2. Material y Métodos. ....	
2.1. Cepas utilizadas. ....	1
2.2. Medios de cultivo y mantenimiento de cepas. ....	1
2.2.1. Medios de mantenimiento. ....	1
2.2.1.1. General. ....	1
2.2.1.2. Selectivo para mutantes. ....	1
2.2.2. De crecimiento. ....	2
2.2.2.1. Medio complejo YPD. ....	2
2.2.2.2. Medio sintético K. ....	2
2.2.2.3. Para selección y aislamiento de mutantes deficientes en actividad hexoquinasa. ....	3
2.3. Métodos de crecimiento. ....	3
2.3.1. En matraz. ....	3
2.3.2. En placas micropocillo. ....	3
2.3.3. En fermentador. ....	4
2.4. Determinación de los parámetros de crecimiento. ....	5
2.5. Determinación de metabolitos y sustratos de fermentación. ....	7
2.5.1. Glucosa. ....	7
2.5.2. Disacáridos. ....	8
2.5.3. Etanol. ....	8
2.5.4. Glicerol. ....	8
2.5.5. Ácido acético. ....	8
2.5.6. Intercambio de gases (oxígeno y CO <sub>2</sub> ). ....	8

2.6. Obtención de extractos enzimáticos y células permeabilizadas.	9
2.6.1. Extractos enzimáticos.	9
2.6.2. Permeabilización.	9
2.6.3. Extractos para la determinación de invertasa.	10
2.7. Determinación de proteína o biomasa en ensayos enzimáticos.	10
2.8. Determinación de actividades enzimáticas.	10
2.8.1. Hexoquinasa.	10
2.8.2. $\alpha$ -glucosidasa.	11
2.8.3. Invertasa.	12
2.8.4. Alcohol deshidrogenasa.	12
2.8.5. Transporte de glucosa.	12
2.8.5.1. Determinación del transporte activo.	12
2.8.5.2. Transporte de glucosa radiactiva.	13
2.8.6. Actividad fosfatasa de hexosas-fosfato.	14
2.9. Obtención y selección de mutantes.	15
2.9.1. Mutantes espontáneos desreprimidos.	15
2.9.2. Aislamiento y selección de mutantes químicamente inducidos.	15
2.9.3. Aislamiento y selección de mutantes con actividad hexoquinasa defectiva o disminuida.	16
2.10. Identificación sistemática de levaduras.	16
2.11. Extracción y análisis de metabolitos internos.	17
2.11.1. Extracción.	17
2.11.2. Valoración de metabolitos intracelulares.	18
2.12. Técnicas cromatográficas.	21
2.13. Técnicas electroforéticas.	22
Resultados y Discusión. ....	
3.1. Caracterización de las enzimas fosforilantes de hexosas en <i>Candida utilis</i> .	24
3.1.1. Caracterización de los parámetros cinéticos de la fosforilación de hexosas en condiciones fisiológicas.	24
3.1.2. Estudio de la respuesta de la actividad hexoquinasa a distintos efectores con significación fisiológica.	26
3.1.2.1. Inhibición por xilosa.	26
3.1.2.2. Inactivación por xilosa.	27
3.1.2.3. Inhibición por trehalosa-6-fosfato.	28
3.1.2.4. Inhibición por ATP libre de magnesio.	30
3.1.2.5. Inhibición por ADP y AMP.	31
3.2. Respuesta de la actividad hexoquinasa según el medio de crecimiento y fase de cultivo y determinación del nivel de represión.	33

3.2.1. Análisis en cultivos en discontinuo.	33
3.2.2. Análisis en cultivos continuos.	35
3.3. Determinación de la relación de la actividad hexoquinasa en el control de la represión catabólica.	39
3.3.1. Búsqueda de mutantes afectados en la actividad hexoquinasa.	39
3.3.2. Inactivación <i>in vivo</i> de la actividad hexoquinasa.	40
3.3.2.1. Efecto inactivador del Cibacron Blue 3G-A <i>in vitro</i> .	42
3.3.2.2. Inactivación <i>in vivo</i> por Cibacron Blue 3G-A.	43
3.3.3. Influencia del paso de fosforilación en el desencadenamiento de la represión catabólica.	46
3.4. ¿Tienen las hexoquinasas de <i>Candida utilis</i> el mismo papel en el control de represión catabólica que el atribuido para estas enzimas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ?	51
3.5. Aislamiento y caracterización de mutantes de <i>Candida utilis</i> con fallos en el control de represión catabólica.	54
3.5.1. Aislamiento de mutantes desreprimidos.	54
3.5.1.1. Selección con EMS.	54
3.5.1.2. Selección de mutantes espontáneos.	54
3.5.2. Estudio del alcance de la desrepresión en los mutantes desreprimidos en cultivos en discontinuo.	55
3.5.2.1. $\alpha$ -glucosidasa.	56
3.5.2.2. Invertasa.	57
3.5.2.3. Transporte activo de glucosa.	57
3.5.3. Estudio de las características de crecimiento en discontinuo de los mutantes desreprimidos.	59
3.5.3.1. Crecimientos en matraz y micropocillo.	59
3.5.3.2. Cultivos en fermentador.	64
3.5.3.3. Desrepresión en mezclas maltosa-glucosa.	64
3.5.3.3.1. Cultivos discontinuos en matraz.	64
3.5.3.3.2. Cultivos continuos en mezclas.	75
3.5.3.4. Regulación de distintas actividades enzimáticas por el flujo glucolítico.	81
3.6. Búsqueda de la base de la desrepresión en el mutante SDM-1.	84
3.6.1. Análisis de la actividad hexoquinasa.	84
3.6.2. Estudio de las cinéticas de transporte de glucosa.	87
3.6.2.1. Cinéticas de transporte en condiciones de desrepresión.	91
3.6.2.2. Cinéticas de transporte en condiciones de represión.	92
3.6.2.3. Dependencia de la actividad de transporte de glucosa por factores ambientales en la cepa SDM-1.	96
3.6.2.4 Relación del transporte con el control del consumo de glucosa.	98
3.6.3. Niveles de metabolitos glucolíticos y actividad metabólica en estados de consumo transitorios.	102
3.7. Comentarios finales.	109

4. Conclusiones. .... 111

5. Bibliografía .....

Nota previa:

Hemos querido que cada uno de los apartados que componen esta Tesis se pueda leer como un bloque independiente y completo en sí mismo, en la medida que esto ha sido posible. Esa es la razón por la que hemos considerado conveniente unir los capítulos de Resultados con el de Discusión.

La numeración escogida en la paginación de esta Tesis ha sido la siguiente: En la introducción hemos optado por una numeración romana. En el resto de los apartados, aquellas páginas que contienen únicamente tablas o figuras no han sido numeradas. También hemos prescindido de numeración en la sección de Bibliografía

Por otro lado, hemos utilizado una nomenclatura habitual para la mayor parte de los parámetros y conceptos utilizados.

$\mu$ , tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

Y, rendimiento en biomasa (g de biomasa/g sustrato consumido ó g/mol).

q, tasa de consumo de sustrato en mmol/(g·h). Estas unidades se han utilizado cuando nos hemos referido a tasas fisiológicas de consumo referidas a células enteras. Cuando hemos cuantificado las tasas de transporte o consumo en células desenergizadas, hemos utilizado la expresión nmol sustrato/(mg proteína·min), ya que esta es la más frecuente en los trabajos de transporte.

D, tasa de dilución ( $h^{-1}$ ).

X, biomasa, expresada como  $DO_{620}$  o en g de materia seca, según se recoge en cada uno de los experimentos.

Por comodidad, debido a la iteración con que aparecen en el texto, en determinadas ocasiones hemos preferido utilizar las siguientes abreviaturas para las enzimas:

HK, hexoquinasa.

GK, glucoquinasa.

## **Introducción**

### 1.1. Efectos de la presencia de hexosas fácilmente metabolizables en el metabolismo de los microorganismos.

La adición de glucosa, u otra hexosa relacionada como fructosa o manosa, a un cultivo con microorganismos provoca una serie de efectos fisiológicos, de forma casi universal, que condicionan el modo que el microbio va a consumir las fuentes de carbono que se encuentren disponibles en el medio. En general, los microorganismos inician un crecimiento sustentado por las hexosas de fácil metabolismo, mientras que el resto de fuentes asimilables permanecen sin ser consumidas.

Los mecanismos por los cuales la glucosa y otras hexosas ejercen este efecto en la mayoría de los microorganismos son variados, pero se traducen en cambios respecto a la cantidad, tipo y funcionalidad de enzimas encargadas en la asimilación de sustratos carbonados. La mayor parte de los fenómenos regulatorios son comunes en todos los grupos de microorganismos, sean procariotas o eucariotas.

En los análisis de lo que ocurre a lo largo del tiempo, desde que se añade a los medios monosacáridos fácilmente metabolizables, se distinguen una serie de eventos casi inmediatos y otros que requieren un plazo más largo para que sean evidentes para el experimentador.

Entre los fenómenos que se manifiestan más tempranamente, se pueden citar los de activación e inactivación de enzimas preexistentes. Fundamentalmente en aquellas implicadas en los circuitos de consumo de fuentes de carbono, desde transportadores a proteínas con función en la glucólisis. Estos se llevan a cabo mediante efectos directos de las hexosas sobre las enzimas y proteínas indicadas, así como por interacciones de otros metabolitos producidos en los circuitos de consumo o relacionados a ellos. Las herramientas moleculares son, a su vez, diversas: se han descrito efectores como el ATP, la fructosa-2,6-difosfato, etc., que ejercen la función por ellos mismos, y mediadores, como proteínas quinasas y proteasas, cuya actividad está condicionada a la presencia de los distintos efectores. El cambio producido en estas actividades pueden ser temporales o permanentes.

Además, pueden ser observados cambios y alteración de la estabilidad y velocidad de procesamiento de los ARNm que contienen la información para distintas enzimas.

Existen, por último, una serie de fenómenos transcripcionales que afectan al grado de síntesis de distintos mensajeros, entre los que destacan la inducción y la represión por metabolito. Estos son los que se producen a más largo plazo, frecuentemente horas después del suministro de azúcares.

**1.1.1. Efectos a corto plazo en el metabolismo de levaduras.** La mayor parte de las investigaciones respecto a la regulación del consumo de fuentes de carbono en levaduras se han llevado a cabo en el modelo *Saccharomyces cerevisiae*.

Son conocidos, desde hace tiempo, los fenómenos de inactivación mediada por proteólisis ocurridos tras la adición de sustratos fácilmente fermentables (como revisión, ver Holzer, 1976; Chiang y Schekman, 1991; Gottesmann y Maurizi, 1992), que llegan a afectar los sistemas de control celular y división. Es especialmente importante la regulación ejercida por este mecanismo en la fructosa-1,6-difosfatasa (Schork y col., 1995), pues después de ser inactivadas por fosforilación (Lenz y Holzer, 1980; Müller y Holzer, 1981), sufren un proceso proteolítico (Gancedo, 1971). La otra enzima fundamental en el paso de un metabolismo gluconeogénico a uno glucolítico, la PEP carboxiquinasa, también está



sujeta a un proceso de fosforilación inducida por glucosa (Burlini y col., 1989), sin afectar la actividad enzimática, tras lo cual es degradada proteolíticamente (Gancedo y Schwerzmann, 1976). Además, son comunes en la renovación de la dotación de transportadores de distintos sustratos asimilables para la levadura (p. ej. ver la revisión de Lagunas, 1993 y Riballo y col., 1995, que citan el caso de los transportadores de maltosa).

El fenómeno más importante registrado en *Saccharomyces* que ha sido expuesto a la presencia de hexosas se manifiesta en el la cadena de respuestas mediadas por la acumulación de AMPc (vía RAS-adenilato ciclase). De esta manera, se produce una amplificación de la señal de glucosa similar en muchos aspectos a la que ocurre en mamíferos tras la estimulación de hormonas (Martin, 1987). El primer fenómeno descrito mediado por AMPc en *Saccharomyces* fue la activación de la actividad trehalasa (van der Platt, 1974).

En esta levadura se puede detectar un incremento transitorio de la concentración de AMPc que tiene amplios efectos sobre distintos blancos (ver Matsumoto y col., 1986; Gibbs y Marshall, 1989; Serrano y Gancedo, 1989; Broach y Deschenes, 1990 y Thevelein, 1991 y 1992). Para que se la aparición de la vía RAS-adenilato ciclase requiere el transporte previo y fosforilación del azúcar, aunque no resulta ser una respuesta específica de la adición de azúcar, pues otras causas pueden activar esta vía, entre ellas una acidificación intracelular.

Las investigaciones respecto a los componentes de la vía RAS-adenilato ciclase han conducido a la identificación de los mismos. Entre ellos se sabe que los productos génicos de los genes RAS1 y RAS2 son equivalentes a la proteína Gs de mamíferos y también son activos en la conformación proteína-GTP e inactivos en la forma GDP-proteína. La proteína del gen CDC25, catalogado como gen relacionado con el crecimiento y control de división, también está implicada en el intercambio de GTP-GDP, de forma que junto a las proteínas RAS son parte indispensable del mantenimiento de la concentración de AMPc. Se han descubierto también distintos equivalentes de los oncogenes ras de mamíferos, con las mismas mutaciones en los aminoácidos correspondientes (p. ej. el RAS<sup>val19</sup> de levadura). La actividad de los genes RAS están mediadas por la interacción con los productos de los genes IRA1 e IRA2, que codifican las llamadas proteínas activadoras de la RAS-GTPasa, aunque, tras la inducción, también tienen el efecto inverso (Thevelein, 1994).

Otras proteínas, como la cap/srv2 (o, más específicamente, la parte N-terminal de esta proteína) también regulan la actividad de la adenilato ciclase (Wang y col., 1991 y Wang y col., 1993).

De esta manera se puede regular la actividad del completo adenilato ciclase que se encarga de la síntesis de AMPc. Este metabolito, una vez sintetizado es degradado lentamente por acción de las fosfodiesterasas Pde1 y 2. Estas esterasas, además, parecen proteger a la célula de la entrada de AMPc foráneo, que desencadenaría respuestas metabólicas no deseadas por la célula (Wilson y col., 1993). El resultado de la diferencia de la velocidad de síntesis y de degradación es la cantidad de AMPc en el interior celular.

Este compuesto activa distintas proteín-quinasas. En esta levadura, las quinasas están compuestas de subunidades catalíticas (codificadas por los genes TPK1, TPK2 y TPK3) y una subunidad reguladora que inhibe la actividad quinasa (codificada por el gen BCY1). Los blancos de las proteín-quinasas que han sido identificados son: la fructosa-1,6-difosfatasa (Müller y Holzer, 1981; Mazón y col., 1982; Rose y col. 1988), el factor transcripcional Adr1, que parece regular la inhibición de la expresión de la ADHII,

reprimible por glucosa (Cherry y col. 1989), la fosfatidilserina sintetasa, y posiblemente la trehalasa, y la fosfofructoquinasa 2 (François y col., 1984). Además las subunidades catalíticas de las proteín-quinasas pueden tener efectos de retroregulación (*feedback*) en la síntesis de AMPc (Thevelein, 1994).

Esta breve descripción de cómo está regulada la síntesis de AMPc da idea del control estricto de la vía RAS-adenilato ciclasa. Esto es así, pues los defectos en este tipo de respuesta a la adición de azúcares al medio de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* son diversos y, en general, muy graves para la célula. Entre los mutantes defectuosos en la concentración de AMPc, se han descrito distintas aberraciones fisiológicas como el incremento de la sensibilidad a choques de calor, la bajada de los niveles de carbohidratos de reserva, fallos en la parada en la fase G1 del ciclo celular en situación de limitación de nutrientes, incapacidad para crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables, etc.

Se ha propuesto que la función real de la vía RAS-adenilato ciclasa sería la de alertar y preparar a la célula de la presencia de altas concentraciones de azúcares en el medio (Thevelein, 1991). Sin embargo, se ha descrito recientemente que el AMPc no solo estaría implicado en este tipo de respuestas tempranas, sino que condicionarían el metabolismo estable de los azúcares presentes en el medio hasta su consumo total (Boy-Marcotte y col., 1996).

Existe otra serie de repuestas derivadas de la adición de glucosa (o fructosa y manosa) a un medio. Sin embargo, a diferencia de las anteriores, su aparición parece estar condicionada a la presencia en el medio de otros factores nutricionales (como la fuente de nitrógeno). Se cree que también está mediada por la síntesis de AMPc. Estos efectos aparecen sin precisar la fosforilación del azúcar. Los blancos que afecta este circuito, parece ser semejante a los de la vía RAS-adenilato ciclasa, además de otros referidos a cambios en la concentración de ribosomas y desaparición de los mensajeros de la catalasa T. A diferencia del anterior mecanismo de respuesta, el efecto es permanente (al menos, mientras exista azúcar suficiente en el medio). Sin embargo, este circuito de respuesta a la adición de fuente fermentables, propuesto por Thevelein (1994) no ha sido estudiado en profundidad.

Otras de las repuestas de la adición de la glucosa es el variación de los niveles de determinados metabolitos, fundamentalmente glucolíticos, que pueden interaccionar directamente con enzimas con la fructosa-6-quinasa y la fructosa-1,6-difosfatasa, como el ATP, AMP, etc. que contribuyen al cambio del paso de un flujo gluconeogénico a otro glucolítico (Avigad, 1981; Bartrons y col., 1982; Lagunas y col., 1982; Hofmann y Kopperschläger, 1982; Reibstein y col., 1986; Gancedo y Serrano, 1989; Kretschmer y Fraenkel, 1991; Gancedo, 1992). Tradicionalmente se ha creído que estas enzimas eran las responsables de ajustar el tipo y cantidad de flujo en levaduras y microorganismos en general, debido a la estricta regulación de la actividad a la que están sometidas. De hecho el Prof. A. Sols definió a la primera enzima no como una enzima sujeta a regulación histerética, sino como una enzima con una regulación *all-hysteric* (Gancedo y Serrano, 1989).

Se han documentado distintos casos que afectan a la cantidad de ARNm que contienen la información de varias actividades catalíticas que se puede detectar tras la adición de hexosas, como los de la enolasa 2, la PGK, la piruvato quinasa, la piruvato descarboxilasa y la ADH I (Moore y col., 1991).

Además existe una serie de efectos de activación de la síntesis y actividad de

enzimas, como son los descritos en la piruvato quinasa (Burke y col., 1983; Gancedo y Serrano, 1989; Moore y col., 1991) y transportadores de glucosa (Özcan y Johnston, 1995; Ciriacy y col., 1995; Reifenger y col., 1995). En algunos casos, la base molecular subyacente a estas activaciones se han relacionado con el nivel de metabolitos de la glucólisis, cuyos niveles varían significativamente tras la adición de glucosa y otras hexosas (Maitra y Lobo, 1971; Boles y col., 1993a; Boles y col., 1993b; Müller y col., 1995; Boles y col., 1996). Así las hexosas-fosfato y triosas-fosfato, inducen los genes de las enzimas fructosa-6-fosfato quinasa, enolasa II, piruvato quinasa, piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa I (responsable de la formación de etanol en condiciones de consumo glucolítico). Es de resaltar, que en esta caso estrictamente, no se puede hablar de repuestas a corto plazo, pues la variación del nivel de síntesis puede ser evidente varias horas después de iniciado el consumo de hexosas, sin embargo, el disparo de la activación se debería a una señal temprana.

Se ha señalado recientemente la influencia en la regulación del consumo temprano de glucosa y hexosas de la trehalosa-6-fosfato (Blázquez y col., 1993), ya que resulta tener un efecto primario como regulador de la actividad hexoquinasa. Se ha propuesto un mecanismo más complejo, en el cual estaría integrado el gen que codifica la trehalasa fosfatasa (TPS1) (Thevelein y Hohmann, 1995). Se ha propuesto que el control real del gen TPS1 que ejercería en los primeros instantes del flujo glucolítico sería en la cantidad de grupos fosfato de los que puede disponer la levadura para llevar a cabo la fosforilación de las hexosas (Blázquez y Gancedo, 1995; Thevelein y Hohmann, 1995).

Todos estos mecanismos desencadenados por la adición de los monosacaridos mencionados anteriormente, son los responsables, en parte, de los cambios metabólicos drásticos en *Saccharomyces cerevisiae*, que han sido observados y descritos desde centurias.

Sin embargo, quizá el mecanismo más importante que afecta a una amplia variedad de rutas y vías catalíticas y que condiciona irreversiblemente el consumo de glucosa y otras hexosas sea el conocido como represión catabólica.

**1.1.2. Represión catabólica en microorganismos.** Desde hace décadas se ha observado que la adición de compuestos fácilmente metabolizables provoca en la generalidad de los microorganismos una imposibilidad para la asimilación de otros nutrientes. Parte de las causas que inducen estos fenómenos se pueden encontrar en las respuestas tempranas a la presencia de monosacáridos que hemos descritos anteriormente. Sin embargo, no son suficientes para explicar los cambios metabólicos tan drásticos que se observan.

La razón de la irreversibilidad del ajuste metabólico se encuentra en la aparición de los fenómenos de represión catabólica. Ésta se puede definir como la ausencia (o descenso muy acusado) de la síntesis de aquellos genes que contienen la información para la toma y asimilación de otros nutrientes distintos de aquel que ha ocasionado la respuesta, mientras la concentración de dicho sustrato esté por encima de un umbral mínimo. El concepto de represión catabólica fue propuesto por Magasanik en el principio de la década de los sesenta, y desde entonces a ocupado a muchos y diversos grupos de investigación.

Generalmente son los compuestos más fácilmente asimilables para los microorganismos los que disparan estas respuestas, sean los que procuran a la célula la fuente de carbono o los que proporcionan la fuente de nitrógeno. En general el umbral de

represión es pequeño, aunque es un parámetro que depende del compuesto, de especie, de cepa y de las condiciones ambientales. Por ejemplo, se ha comunicado que distintas cepas naturales de la levadura *Pichia stipitis*, utilizada para la degradación de residuos con altas concentraciones de pentosas, son incapaces de asimilar xilosa cuando la concentración de glucosa es tan pequeña como 0.1 g/l o tan grande como 10 g/l, según las cepas ().

Los primeros estudios sobre la regulación de la represión catabólica se efectuaron teniendo como modelos las bacterias (Saier, 1989).

En sistemas procariotas (*E. coli* fue el modelo) se observó que la presencia de glucosa induce una caída de los niveles de AMPc intracelular. La utilización de mutantes permeables a AMPc exógeno permitió comprobar que altos niveles de AMPc permitían revertir el efecto represor de la glucosa, al menos respecto a la utilización de lactosa y otros azúcares. En esta levadura se determinó la presencia de la proteína CAP (*catabolite activator protein*) que es afín al AMPc. Esta proteína puede unirse a determinadas zonas codificantes de ADN bacteriano, de forma que activa la transcripción de determinados genes implicados en el metabolismo de fuentes de carbono.

La ausencia de AMPc implica la casi ausencia de función de la proteína CAP. Así el AMPc es el mensajero de la presencia de glucosa. El mecanismo por el cual el azúcar provoca el descenso de los niveles de AMPc es el siguiente:

La glucosa es transportada al interior celular mediante una serie de proteínas denominadas, que inducen la translocación de la glucosa, de forma que el azúcar se presenta en la cara citoplásmica de la membrana plasmática en su forma fosforilada (glucosa-6-P). El fosfato necesario para el transporte de glucosa es obtenido de la desfosforilación de PEP mediante una cascada compleja.

El PEP es desfosforilado a pirúvico y el resto fosfato pasa a una proteína  $E_T$ , que, a su vez, es capaz de fosforilar a la llamada proteína HPr. Esta última transfiere el grupo fosfato a una serie de proteínas transportadoras (proteínas II), que son específicas de cada sustrato que transportan. Así la proteína  $II^{Glc}$  permite al paso de glucosa al interior celular, transfiriendo el fosfato que procedía de la proteína HPr.

Pero, en la transferencia del grupo fosfato entre la HPr fosforilada y el transportador existe un intermediario, la proteína  $III^{Glc}$ . Esta proteína es bifuncional, pues también tiene la cualidad de interaccionar con la adenilato ciclasa y transportadores de otros azúcares que no permiten al sistema PTS (translocadores de grupo).

La proteína  $III^{Glc}$  es capaz de activar la adenilato ciclasa solo en su forma fosforilada. Sin embargo, es en la forma no fosforilada como inhibe la acción de los transportadores no pertenecientes al sistema PTS.

Fisiológicamente, al forma más abundante de la proteína  $III^{Glc}$  en presencia de glucosa es la forma no fosforilada, de esta manera se encuentran bloqueados los sistemas de transporte de otros azúcares y, además la adenilato ciclasa se encuentra prácticamente inactiva.

Independientemente de este sistema de regulación general, existen otros que actúan de forma específica, afectando a un número reducido de genes.

En lo referidos a hongos filamentosos, en los modelos estudiados, fundamentalmente *Aspergillus nidulans*, se ha determinado un componente central que regula la represión catabólica, además de los que tienen un espectro de acción restringido (Arst y Scazzocchio, 1985). Las proteínas de los genes *creC* y *areA* son las responsables del control de las fuentes de carbono y nitrógeno, junto con el *pacC*, responsable de la

regulación del circuito de repuesta a pH extracelular. Mutaciones en estos genes que contienen la información de estas proteínas presentan series defectos fisiológicos o, incluso, provocan la pérdida de la viabilidad celular.

1.1.2.1. **Represión catabólica en *Saccharomyces cerevisiae*.** Las primeras observaciones sobre los desencadenantes de la aparición de la represión por glucosa en esta levadura tuvieron como conclusión preliminar que también aquí la adición de hexosas conducía a una bajada de los niveles de AMPc. Se ofreció así un panorama semejante a lo que se pudo observar en bacterias gram negativas. En principio, estas observaciones estaban en consonancia con el viejo concepto de la universalidad metabólica.

Sin embargo, mediciones más exhaustivas y controladas de las variaciones del nivel AMPc confirmaron que la respuesta respecto a la concentración de AMPc en función a la adición de hexosas es distinta a la que se había descrito en bacterias. Al contrario que en procariotas, la adición de glucosa, como ya hemos mostrado, provoca un incremento temporal de AMPc (Matsumoto y col., 1983; Eraso y Gancedo, 1984; Gancedo y Serrano, 1989). Además, otras evidencias indicarían que, aunque el AMPc provoca una serie de respuestas regulatorias tempranas en la levadura, carece de función en la regulación de la represión catabólica.

Tenemos que indicar también que no se pueden dividir los sustratos, en función de la capacidad para disparar la represión, en represores y no represores. Así, por ejemplo, la galactosa y la maltosa son capaces de reprimir las vías gluconeogénicas, aunque, al contrario que la glucosa, fructosa o manosa, no afectan a las implicadas en el consumo de otras fuentes de carbono glucolíticas. Aun así, para que se desencade la represión parece imprescindible el transporte y fosforilación del represor.

Esto indica, entre otras pruebas experimentales, que la represión catabólica no está sujeta a un único circuito de regulación. Parece, al contrario, que cada una de las vías sujetas a represión por glucosa tienen su propio circuito de represión, aunque alguno de los factores regulatorios pueden tener función en varios de los circuitos de represión.

Las vías sujetas a represión catabólica son:

- ▶ El transporte y consumo de otras fuentes de carbono distintas a los represores. Afectan fundamentalmente al metabolismo de otros azúcares y oligosacaridos asimilables.
- ▶ La vías gluconeogénicas.
- ▶ El ciclo del glioxilato.
- ▶ El ciclo de Krebs y la cadena de transporte electrónico.

Por otro lado, el nivel de represión de las enzimas situadas en cada una de las vías afectadas por la represión varía, como se puede apreciar en la **Tabla A**.

En un estudio de aquellos factores situados en los pasos superiores de la represión y que son capaces de afectar a distintas vías reprimibles, quizá el más estudiado sea la hexoquinasa PII. Esta es una de las tres isoenzimas que fosforilan hexosas en *Saccharomyces cerevisiae*, junto a la HK PI y la glucoquinasa (GK). Parece que es la única de las tres que además de la función catalítica tiene un papel regulador. Sin embargo, es muy amplio la cantidad de genes y vías que pueden ser controladas mediante la hexoquinasa PII, básicamente los implicados en la toma de otras fuentes de carbono (**Tabla**

**B).**

A pesar de que hace casi dos décadas que se conoce la función reguladora de la proteína codificada por el gen HXK2 (Entian, 1977; Entian, 1980), no se sabe cual es el mecanismo molecular por el cual ejerce el control en la expresión de otras enzimas.

Se ha propuesto que en el gen de esta enzima se pueden reconocer dos regiones, una catalítica y otra reguladora (Entian y Frölich, 1984a). Sin embargo, otros estudios muestran que es únicamente preciso alta cantidad de actividad catalítica para que se dispare la represión (Ma y col., 1989). Además, se han propuesto otros mecanismos de regulación que contendría esta enzima. Entre ellos destaca la capacidad de actuar como una proteín-quinasa (Herrero y col., 1989).

Esta enzima está sujeta a regulación de la cantidad de síntesis por fuente de carbono. La síntesis aumenta considerablemente en presencia de glucosa y disminuye drásticamente en presencia de fuentes oxidables como etanol (Moreno y col., 1994). La razón de esta regulación por fuente de carbono se ha explicado por la presencia de 2 secuencias en la región promotora y codificante del gen que pueden ser blanco de factores de represión de la expresión del gen en situaciones fisiológicas de desrepresión (Martínez-Campa y col., 1996).

Otros genes son requeridos para la desrepresión, entre los que tienen un efecto más amplio se puede indicar el gen CAT1/SNF1 (que codifica una proteín-quinasa). Este gen y el HXK2 condicionan el nivel de actividad de gran cantidad en enzimas en función de la fuente de carbono, de forma que parecen que están situadas en el nivel más alto del control de represión encontrado hasta ahora. Sin embargo, se ha de resaltar que la delección de la HK PII o de la totalidad de las enzimas fosforilantes de hexosas en *Saccharomyces*, no tiene los efectos deletéreos que ocurren al eliminar las piezas clave de represión de hongos filamentosos. Aunque es suficiente una mutación *hvk2*  $\Delta$ , para obtener unos fenotipos desreprimidos para el consumo de otros azúcares.

Existen una serie de genes situados en un peldaño inferior de la secuencia de represión que también tienen un papel amplio en el control de síntesis de otras enzimas. Entre ellos, se pueden citar los genes HEX2/REG1 y GRR1/CAT80. Sin embargo, la mutación de estos genes no solo implican el efecto directo esperado de alivio en el nivel de represión en los mutantes, sino que tienen otros efectos distintos. La regulación de la función de estos genes parece ser complicada, pues se han descrito una serie de subunidades catalíticas (p. ej. la proteína del gen CAT3/SNF4).

En un nivel inferior se sitúa el factor transcripcional codificado por el gen MIG1, capaz de unirse a la región reguladora de muchos genes de levadura (Nehlin y Ronne, 1990; Nehlin y col., 1991). El mecanismo que dispara la represión es la unión de la proteína del gen MIG1 con las proteínas de los genes SSN6/CYC8 y TUP1, para formar un complejo (Keleher y col., 1992). El estudio de la estructura de la proteína de gen MIG1 explica porque el estudio de la represión catabólica no es importante sólo por un interés meramente básico, sino como herramienta para entender la regulación de ciertos mecanismos regulatorios de organismos superiores, especialmente el control del desarrollo de tumores (Hartwell, 1992). Es una proteína en la que se ha definido unos dominios tipo *zinc-finger*, de forma semejante al factor de respuesta temprana de crecimiento (EGR) y a la proteína del tumor de Wilms (Nehlin y Ronne, 1990). Por otro lado, la proteína del gen TUP1 es semejante a las proteínas STE4, CDC4, CDC20, MAK11 y a la proteína disparador del corte del desarrollo neuronal de *Drosophila melanogaster* (Williams y Trumbly, 1990, citado en

Trumbly, 1992).

Parece que la activación del gen implicado en la desrepresión CAT1/SNF1 (Celenza y Carlson, 1986) es el que implica la disgregación del complejo de proteínas ssn6/cyc8-tup1-mig1 (Celenza y Carlson, 1989). Otra vez se observan semejanzas con otros sistemas regulatorios, pues la proteína cat1/snf1 es similar al factor CDC28 de levadura y a distintas proteínas quinasas de mamíferos (Celenza y Carlson, 1986 y 1989). Recientemente, se ha comunicado la función del gen CAT5 que parece fundamental en la desrepresión de enzimas gluconeogénicas (fructosa bifosfatasa y PEP carboxiquinasa) además de enzimas del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa) (Proft y col., 1995).

Además existen una serie de genes que median en la represión de alguna de las vías particulares del consumo de ciertos sustratos. La glucosa parece que actúa sobre alguno de los componentes necesarios para la inducción de algún componente de la vía en concreto. Por ejemplo, sobre el gen GAL4 (Gal4p) en el circuito del consumo de galactosa (genes GAL) (Johnston, 1987), actuando sobre el transportador de maltosa para reprimir el consumo de maltosa (genes MAL) (ver Vanoni y col., 1989), o sobre las proteínas de los genes HAP2 y HAP4, para reprimir la síntesis de los genes CYC, inducidos por oxígeno (ver Forsburg y Guarente, 1989).

También se ha descrito el circuito de represión de los genes necesarios para el consumo de sacarosa (genes SUC), donde el componente más regulado es el gen SUC2, que expresa la invertasa.

(Se puede obtener una información más detallada del control de represión de cada uno de los circuitos consultando las ref. de Entian y Barnett, 1992; Trumbly, 1992 y Gancedo, 1992).

Todos los efectos que hemos mostrado someramente explican los cambios diversos, fácilmente cuantificables en laboratorio, que se observan en *Saccharomyces cerevisiae* cuando pasa de un crecimiento utilizando fuentes oxidables a otro con glucosa. Entre otros, el reemplazamiento del metabolismo oxidativo por otro preferentemente fermentativo, con producción de etanol a concentraciones altas de glucosa (efecto Crabtree), por represión de las enzimas de la cadena de transporte electrónico y ciclo de Krebs. Imposibilidad de consumo simultáneo con fuentes glucolíticas y gluconeogénicas, como el etanol producido en la fermentación. Todo ello implica una caída en el rendimiento en biomasa en cultivos con glucosa u otra fuente de carbono fermentable y la aparición de la llamada diauxia, consistente en la compartimentalización del crecimiento con una variedad de fuentes de carbono, donde el primer tramo de crecimiento se realiza sobre el sustrato represor y el segundo utilizando el resto de fuentes de carbono reprimibles. Frecuentemente existe una fase de cese o atenuación de la velocidad de crecimiento entre los períodos de consumo, que se debe a la adaptación de la maquinaria enzimática para iniciar la asimilación de los sustratos remanentes.

Independientemente del tipo de metabolismo con el que se consume los azúcares del medio, parece que la tasa metabólica depende fuertemente de la velocidad de transporte del azúcar (Gancedo y Serrano, 1989; Lagunas, 1993). Así, en el estudio de la regulación del consumo de glucosa y otras fuentes de carbono adquieren relevancia también los estudios del transporte de glucosa.

Se han descrito más de una docena de genes (HXT) en *Saccharomyces* que codifican una secuencia que los hace presumir transportadores de glucosa semejantes a

---

otros genes semejantes de mamíferos e incluidos dentro de una familia de proteínas transportadoras de glucosa; la familia *Glut* (Bisson y col., 1993; Marger y Saier, 1993; André, 1995). Aunque parece que no todos tienen una función en condiciones de laboratorio transportadores (Özcan y Johnston, 1995; Ciriacy y col., 1995; Reifemberger y col., 1995). Son innumerables los trabajos referidos a la regulación del transporte de glucosa, que presentaremos a lo largo de la memoria de esta Tesis, junto con sus conclusiones.

Al buscar referencias sobre estudios de la regulación de la toma sustratos por glucosa en otras levaduras distintas a *Saccharomyces*, el panorama se restringe a unos ejemplos escasos. Se ha documentado en otras especies de levadura la importancia en el control de represión de la actividad hexquinasa, como en *Schwanniomyces occidentalis* (Mc Cann y col., 1987) y *Pachysolen tannophilus* (Wedlock y Thornton, 1989; Wedlock y col., 1989). Esto puede inducir a considerar que los circuitos de represión, y en concreto el papel de las hexoquinasas en el control de represión, en otras levaduras serían semejantes a los descritos en *Saccharomyces*.



## Introducción

**Tabla A.** Variaciones de la actividad de enzimas sujetas a represión catabólica<sup>1</sup>.

enzima	factor de represión (Act. sin glucosa/act. con glucosa)
invertasa	750
alcohol deshidrogenasa	120
maltasa	90
malto sintetasa	80
isocitrato DH (NADP dependiente)	80
PEP carboxiquinasa	60
fructosa-1,6-difosfatasa	50
isocitrato liasa	50
galactokuinasa	40
glutamato DH (NAD dependiente)	25
aconitasa	5
citocromo c oxidasa	5
isocitrato DH (NAD dependiente)	4

<sup>1</sup> Tomado de Gancedo, 1992.

**Tabla B.** Enzimas afectadas por la acción de la HK PII<sup>1</sup>.

enzima	acción de HK PII
$\alpha$ -glucosidasa	+
invertasa	+
galactokinasa	+
citocromos	+/-
isocitrato liasa	-
fructosa bifosfofatasa	-

<sup>1</sup> Datos tomados de Gancedo, 1992.

**1.2. Cómo afecta la represión catabólica en determinados procesos industriales con levaduras. El ejemplo de *Candida utilis*<sup>1</sup>.**

Las levaduras han sido utilizadas en los primeros procesos biotecnológicos que ha desarrollado la humanidad. Por ellas ha sido posible la elaboración del pan y de bebidas alcohólicas. Las necesidades de levadura son muy importantes en la sociedad actual, p. ej. en el mundo se producía la década pasada 2.2-2.4 Tm de levadura seca al año y el consumo de levadura de panadería en Europa era 1.2-1.8 Kg/habitante (Trivedi y col., 1986). Hasta hace un tiempo históricamente corto, los sustratos sobre los que se producían las fermentaciones eran de procedencia natural y sin una composición compleja. En los medios de producción es común la presencia de una variedad de fuentes de carbono asimilables para las levaduras, entre las que se encuentran las hexosas que pueden acarrear la aparición de represión catabólica (Tabla C).

**Tabla C.** Azúcares en distintos medios utilizados para el crecimiento de levaduras, en porcentaje de sólidos totales

composición media de melazas <sup>1</sup>		
	de caña de azúcar	de remolacha
sacarosa	45.5	63.5
rafinosa	0	1.5
azúcar invertido	22.1	0
otros	5.5	1.5
composición de caldos para fermentación alcohólica y mostos <sup>2</sup>		
glucosa	14.2	
fructosa	3.6	
maltosa	53.2	
maltotriosa	13.1	

<sup>1</sup> De Reed y Nagodawithana (1991). <sup>2</sup> De Renger (1991).

<sup>1</sup> Durante toda la Memoria de esta Tesis, hemos denominado a nuestra levadura con el nombre de *Candida utilis*, a pesar de que, desde el punto de vista de la clasificación sistemática, no es correcto. Recientemente se ha descubierto que las cepas englobadas como *Candida utilis* (Hennenberg) Lodder & Kreger-van Rij (antes *Torula utilis*) son, en realidad, los anamorfos (sin ciclo sexual conocido) de *Pichia jadinii*, ya que en experimentos de reasociación de ADN, ambos materiales genéticos se muestran semejantes en un 85% (Barnett y col., 1990). Pero el nombre sistemático no es tan conocido como el anterior e, incluso, se mantienen la denominación de *Candida utilis* en las referencias bibliográficas más recientes.

Sin duda, el socio microbiológico industrial más antiguo y fiel del hombre ha sido *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, durante estas últimas décadas la búsqueda de otras levaduras con las que desarrollar nuevos procesos biotecnológicos, ha conducido al hallazgo de otras numerosas especies con aplicación industrial, entre ellas *Candida utilis*.

Desde la Segunda Guerra Mundial esta levadura se ha utilizado como fuente y complemento de proteínas en la alimentación humana y animal (Boze y col., 1992). Así, ha sido una de las especies más utilizadas en la producción de SCP (*Single Cell Protein*), término acuñado por C. L. Wilson en 1966 (en Lichfield, 1979). El problema sanitario ocasionado por una dieta deficiente en poblaciones depauperadas, con una alimentación consistente casi exclusivamente en cereales, es alto y nuestra levadura, entre otras, ha venido a rellenar los requerimientos de aminoácidos deficientes en cereales, como lisina, metionina, y treonina en estas zonas (Fogel y Welch, 1987; Halász y Lásztity, 1991).

Los microorganismos son perfectos para estos fines, pues contienen un alto contenido en proteínas digeribles, con abundancia de aminoácidos esenciales.

En general, los microorganismos son excelentes para este fin, por la rápida producción de biomasa, la capacidad de crecimiento sobre una amplia variedad de medios y residuos agrícolas e industriales baratos. Además, muy frecuentemente las levaduras tienen una serie de ventajas sobre las bacterias (Boze y col., 1992); estas son: el característico pH óptimo de crecimiento ácido permite producciones industriales sin cuidado de contaminaciones de origen bacteriano. Además, la utilización de levaduras disminuye considerablemente el riesgo de desarrollo de respuestas inmunológicas en los consumidores y son raros los casos de enfermedades provocadas por especies patógenas. Hasta donde sabemos, solo se ha comunicado un caso de infección por *Candida utilis* en un enfermo afectado por SIDA (Alsina y col., 1988).

Los requerimientos para la producción de levadura son escasos, pues para conseguir 100 g de levadura seca se precisan 200 g de sustratos que sirvan como fuente de carbono, 25 g de amoníaco, 15 g de sulfato y 7 g de fosfato amónico. Muy frecuentemente, no se precisa una composición muy estricta en oligoelementos y vitaminas (Costa, 1974). En levaduras se ha descrito como unos iones pueden desplazar funcionalmente a otros con, relevancia fisiológica en el caso de una insuficiente concentración de los iones reemplazados (Dedyukhina y Eroshin, 1991).

*Candida utilis* resulta ser un organismo productor de biomasa más favorable que *Saccharomyces cerevisiae* por las siguientes características: No necesita el suplemento de ningún aminoácido en los medios de producción, los requerimientos respecto las vitaminas del grupo B son escasos, es capaz de asimilar pentosas, como la xilosa, y puede crecer en medios con una fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, con pequeñas cantidades de otros nutrientes y factores de crecimiento (Lichfield, 1979). Además resulta ser más afín por hexosas que *Saccharomyces cerevisiae* (Postma y col., 1989a).

Los procesos industriales de producción de *Candida utilis* han utilizado lejías sulfúricas (p. ej. Vrána, 1960, ejemplos en Boze y col., 1992), y residuos carbonados procedentes de actividades agrícolas e industriales. Es sobre estos últimos sustratos donde la producción española ha sido más activa, ya que se han utilizado residuos de orujos de uva y destilerías (en López Garcés, 1989).

La primera vez que se comunicó el crecimiento sobre residuos de hidratos de carbono de *Candida utilis* fue a partir de aguas de lavado de almidón (Reiser, 1954). Desde

entonces, se ha desarrollado distintos procedimientos industriales en los que, generalmente, se han utilizado fuentes abundantes en los lugares de origen (melazas en Europa, residuos de turberas en Canadá, jugo de pita en Méjico, etc). La tasas de producción pueden apreciarse en la **Tabla D**:

En esta tabla no aparecen los datos de producción de una levadura, presumiblemente *Candida utilis*, en la antigua República Democrática de Alemania. Los comunicantes afirmaron producir varios trenes diarios cargados de levadura seca, capaz de alimentar a los animales de miles de granjas porcinas y avícolas, a partir de residuos producidos en un complejo de refinerías petrolíferas (informes CHEM/SEM.15/R.16 y CHEM/SEM.15/R.30 de los seminarios del Comité de la Industria Química, de la Comisión para Europa de la ONU, 1986).

**Tabla D.** Producción anual de *Candida utilis* en el mundo por distintos procedimientos<sup>1</sup>.

fuelle de producción	microorganismo	producción (Tm/año)	país
etanol	<i>C. utilis</i>	$7 \cdot 10^3$	E.E.U.U.
desechos de patata	<i>Endomyces fibuliger</i> + <i>C. utilis</i>	$10 \cdot 10^3$	Suecia
fugo de pita	<i>C. utilis</i>	$1.4 \cdot 10^3$	Méjico
desechos de papel	<i>C. utilis</i>	$5 \cdot 10^3$	E.E.U.U.

<sup>1</sup> Fuente: López Garcés (1989).

Se puede observar como la producción sueca es la mayor, entre las confirmadas y conocidas comercialmente. El procedimiento que utiliza es el llamado proceso SYMBA (Jarl, 1969), donde la producción de biomasa se realiza en dos pasos. En el primero, una levadura (*Endomyces fibuliger*, antes llamada *Saccharomycopsis fibuliger*, y *Endomycopsis fibuliger* (Barnett y col., 1990)) hidroliza el almidón añadido al medio como fuentes de carbono. Los productos de la hidrólisis que no son aprovechados para la formación de biomasa de la primera levadura, son inyectados en fermentadores con *Candida utilis*. Esta última levadura acaba desplazando a *Endomyces fibuliger*, de forma que el 98% de la biomasa final es *Candida utilis*. Los datos comerciales de la producción por parte de la Swedish Sugar Company, fueron suministrados por los fabricantes de fermentadores Chemap. Estos son: La producción comercial se inició en 1973 y, hasta donde podemos saber, continúa actualmente. Se pueden tratar 20 m<sup>3</sup>/h de aguas residuales de una fábrica procesamiento de patatas, con una concentración de almidón del 2-3%. Se producen unos 250 Kg/h de levadura seca. La reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO) en los efluentes es del 90% (catálogo Chemap).

A lo largo del tiempo se han publicado artículos que mejoran las condiciones iniciales de producción propuestas por Jarl (por. ej. Lawford y col., 1979; Admassu y

Korus, 1983; Sá Correia, 1984; Peinado y col., 1987b). Sin embargo, no se han podido solucionar los problemas de producción que conlleva este proceso.

Se puede entender fácilmente que la producción de biomasa microbiana ha de llevarse a cabo con la utilización de residuos baratos, pues el producto es de muy bajo valor añadido. Aunque tras las crisis repetidas de energía, la producción de SCP ha dejado de ser rentable en muchos casos, todavía resulta ser un foco de investigación debido a la reducción de la DBO que se puede conseguir tras tratar los residuos industriales y agrícolas antes de su vertido. Por otro lado, en los últimos años se ha comunicado nuevas aplicaciones de *Candida utilis*, donde el producto es de alto valor añadido: como la producción de determinados alcoholes de cadena larga (Derrick y Large, 1993), la producción de glucomananos con una potencial aplicación en el tratamiento de tumores (Kogan y col., 1993) y como fuente de ARN en fermentadores *air-lift* (Ichii y col., 1993).

De esta manera, la forma más provechosa de producción, cualquiera que seas el fin de la utilización de *Candida utilis*, es la utilización de cultivo continuo. Con esta técnica, se puede conseguir producciones y tratamientos de residuos permanentes, manteniendo un caudal constante de adición de medio fresco y de eliminación de caldo del fermentador. Así, se pueden conseguir cultivos con un caudal constante, donde el medio y la biomasa es lavado continuamente.

En principio, es importante ajustar esta tasa de lavado de los fermentadores a los valores más altos posibles. Se consigue de esta manera una alta velocidad de tratamiento de residuos y una alta tasa de producción de biomasa. Esta última ventaja es debida a que, al aumentar la velocidad de adición de nutrientes en cultivos estables, la tasa con que los microorganismos pueden consumir los sustratos añadidos es mayor y la cantidad de biomasa formada por unidad de tiempo es alta (se describe con más detalle la técnica de cultivo continuo en Material y Métodos).

Sin embargo, si los medios llevan en su composición hexosas que ocasionan represión, cuando se mantienen altas tasas de adición de medio, la concentración instantánea de los sustratos represores aumenta por encima de los umbrales de represión. Si esto sucede, los microorganismos inician el consumo específico de los sustratos represores, mientras que las otras fuentes de carbono asimilables no pueden ser consumidas. El efecto inmediato es que desciende la concentración de biomasa en el fermentador (y, por tanto, la tasa de producción) y aumenta el contenido de compuestos carbonados en el efluente (con lo que no se consigue unas buenas depuraciones, al mantenerse altos niveles de DBO). En nuestra levadura, la aparición de represión completa de la toma de otros azúcares es completa cuando la concentración de glucosa es de 0.1 g/l (Peinado y col., 1987b).

Todos los procesos de producción de biomasa de *Candida utilis* están obligados a mantener bajas tasas de adición de medio fresco a los fermentadores para evitar la aparición de la represión catabólica. De esta forma no se consiguen los valores de producción que serían posibles sin la existencia de represión.

Independientemente de el impacto que produce la aparición de represión catabólica en usos aplicados de nuestra levadura, es importante el estudio de este fenómeno por motivos de interés básico.

*Candida utilis* resulta ser un modelo de levadura distinta a *Saccharomyces cerevisiae*, ya que ambas resultan ser levaduras que muestran respuestas muy distintas respecto a la regulación de su metabolismo de fuentes de carbono.

Nuestra levadura muestra en metabolismo respiratorio, donde menos del 30% de la glucosa metabolizada es fermentada, mientras este porcentaje es mayor en *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aerobias (Gancedo y Serrano, 1989).

Por otro lado, *Candida utilis* es una levadura donde se ha descrito una respuesta positiva en el efecto Pasteur, cuando a este se le define como el descenso del consumo de azúcar en condiciones aerobias, comparado con el que se observa en limitación de oxígeno (Gancedo y Serrano, 1989). A pesar de lo que se ha asumido tradicionalmente, *Saccharomyces cerevisiae* no es una típica levadura Pasteur + (Gancedo y Serrano, 1989). Esta confusión viene dada de malinterpretación la observación de Pasteur de que "La levadura es capaz de crecer en una solución con azúcar en una completa ausencia de oxígeno y aire. En este caso, una pequeña cantidad de levadura es formada y una gran cantidad de azúcar desaparece, 60 u 80 partes de azúcar por parte de levadura... Si el experimento es hecho en presencia de aire... solo 4-10 partes de azúcar son transformadas por cada parte de levadura obtenida" (traducción tomada de Lagunas, 1986).

Además, *Candida* no es una levadura que muestra el efecto Crabtree, esto es, la existencia de fermentación alcohólica en condiciones aerobias (van Dijken y Scheffers, 1986). En condiciones donde existe altas concentraciones de glucosa, la fermentación del azúcar supone la mayor vía de consumo del azúcar en el metabolismo, en aquellas levaduras que muestran este efecto, entre ellas *Saccharomyces cerevisiae*.

A diferencia de *Saccharomyces*, nuestra levadura está definida como Kluyver + respecto a ciertos azúcares (Barnett y col., 1990), si definimos este fenómeno como: "La imposibilidad para fermentar algunos disacáridos a etanol y dióxido de carbono, incluso cuando el metabolismo respiratorio de los disacáridos y la fermentación alcohólica de las hexosas componentes de éstos es posible". (Weusthuis, 1994).

Por otro lado, *Saccharomyces* es incapaz de consumir ciertos compuestos simultáneamente con glucosa, por ejemplo, el alcohol de fermentación o añadido exógenamente. Nuestra levadura si puede consumir ambas fuentes de carbono, tal como han comunicado Vraná y col. (1989) y Weusthuis y col. (1994a).

Todo ello da idea de las diferencias que se pueden encontrar entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*. La cuestión por la que nos hemos preguntado durante la realización de esta Tesis es:

¿La regulación de la represión catabólica en *Candida utilis* es parecida a la que muestra *Saccharomyces cerevisiae*?

La aproximación más accesible para nosotros fue, en principio estudiar la regulación por fuente de carbono de las hexoquinasas, ya que estas tienen una función fisiológica fácilmente accesible para el experimentador y están implicadas en el control de represión de un alto número de genes, sobre todo, de aquellos implicados en el consumo de fuentes de carbono.

### 1.3. Hexoquinasas en los microorganismos.

Se han descrito estas enzimas desde hace más de 60 años (Kalckar, 1985). Tienen la propiedad de fosforilar en el sexto carbono las hexosas que entran en el flujo glucolítico, como la glucosa, la fructosa y la manosa. Se han encontrado en todo los grandes grupos de microorganismos, arqueobacterias, eubacterias, algas unicelulares, protozoos y hongos unicelulares y filamentosos. En general se pueden dividir sistemáticamente las hexoquinasas en función de los sustratos que fosforilan. Aquellas enzimas capaces de utilizar glucosa y manosa son denominadas glucoquinasas (GK), mientras que las que también pueden usar fructosa son llamadas hexoquinasas (HK). En general, estas son las enzimas que se pueden encontrar en los microorganismos y otros seres pluricelulares. De todas maneras, se han descrito enzimas específicas por un único sustrato, como las fructoquinasas en grupos de protozoos y bacterias (Mertens y Müller, 1990 y citados en Garfinkel y col., 1989 y Woolfitt, y col., 1988).

Las hexoquinasas son enzimas que requieren la presencia de 2 sustratos para su funcionamiento. En levaduras, se ha descrito que la molécula que es capaz de donar el grupo fosfato para la fosforilación de hexosas en condiciones fisiológicas es el ATP. Además otros sustratos capaces de ceder un grupo fosfato pueden ser empleados por estas enzimas, como el ADP, el Pi, el PEP, creatina-P, GTP; CTP y UTP aunque en general solo cuando el nucleótido está presente en altas concentraciones en la mezcla de reacción y con escasa efectividad. Existen otros sustratos sobre los cuales las hexoquinasas pueden actuar, por ejemplo, aquellos análogos de glucosa que poseen una modificación en el carbono 2, como la 2-desoxiglucosa (especialmente las HK). Sin embargo, no se ha descrito actividad quinasa con N-acetilglucosamina, análogos de glucosa alterados en el carbono 3, galatosa, ribosa, arabinosa y disacáridos, al menos en *Saccharomyces cerevisiae* (Maitra, 1975).

Cuando se ha estudiado la importancia de estas enzimas en el control de la velocidad de glucolisis en levaduras, se ha concluido que, en general la actividad máxima de estas enzimas se halla en exceso en comparación con el flujo de consumo de azúcares por lo que no se ha supuesto (Gancedo y Serrano, 1989; Galazzo y Bailey, 1990)

**1.3.1. Hexoquinasas en *Candida utilis*.** nosotros abordamos en un trabajo previo el estudio de la caracterización de la actividad hexoquinasa en nuestra levadura de trabajo, *Candida utilis* (1991). Esta sería la única posibilidad en trabajos fisiológicos con nuestra levadura, pues es el único peldaño en el circuito del control de represión catabólica sobre el que es posible actuar sin precisar la utilización de herramientas de Biología Molecular, ya que solo hasta tiempos muy recientes no se ha descrito ningún sistema que nos permitiera el estudio genético de *Candida utilis* (Kondo y col., 1995).

Tras una serie de análisis cromatográficos pudimos separar tres actividades enzimáticas. Dos de ellas eran capaces de fosforilar las tres hexosas: glucosa, fructosa y manosa. Por su afinidad por la fructosa fueron descritas como hexoquinasas. La tercera no utilizaba fructosa como sustrato, de acuerdo a la definición de las glucoquinasas. En los análisis realizados con extractos obtenidos en las distintas fases del crecimiento con glucosa, pudimos observar que una de las hexoquinasas (la llamada HK 1), era responsable de más del 90% de la capacidad de fosforilación de la fructosa contenida en nuestra cepa. La otra hexoquinasa, minoritaria (HK 2), no pudo ser aislada en cantidades suficientes que permitieran un estudio bioquímico completo.

Cuando analizamos las cinéticas de fosforilación de los sustratos naturales, encontramos las siguientes constantes (**Tabla E**):

La hexoquinasa mayoritaria poseía un coeficiente F/G de 1.2-1.3. Esta característica, unida a que encontramos que era parcialmente inducida cuando la concentración de glucosa era alta, nos hizo pensar que podía ser una enzima similar a la HK PII de *Saccharomyces cerevisiae*. También otros datos nos indujeron a considerar a esta enzima como el análogo en *Candida* de la hexoquinasa mayoritaria de *Saccharomyces*. Fueron sus respuestas a la regulación por xilosa, en las condiciones experimentales en las que el trabajo fue hecho. Existía un dato que hacía particular a esta enzima, la alta afinidad por manosa. Hasta entonces no se había descrito una hexoquinasa con una afinidad en el rango de  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, recientemente, se ha comunicado la presencia de una hexoquinasa inusual en *Schizosaccharomyces pombe* (Petit y col., 1996), con una alta afinidad para la manosa.

La GK pareció ser una enzima sin ninguna característica diferencial al resto de proteínas similares descritas en la bibliografía. Sin embargo, como ya describieron Frölich y Entian (1984b), poseía una extremada labilidad. Esta es la razón por la que, en un principio, describimos para esta enzima una inhibición por glucosa. Estudios posteriores realizado en condiciones *in vivo* nos hicieron desechar esta hipótesis.

La GK fue parcialmente reprimible por glucosa, como ya se había descrito al analizar esta actividad en *Saccharomyces*.

El panorama que describimos entonces era que nuestra levadura poseía una dotación enzimática para la fosforilación de hexosas similar a la que se había descrito en *Saccharomyces cerevisiae*, aunque las afinidades por los sustratos de las enzimas analizadas, las hacían más parecidas a las hexoquinasas de géneros no-*Saccharomyces*, como se aprecia en la tabla anterior. La regulación por glucosa de las distintas hexoquinasas, también la asemejaba a la que se observó en *Saccharomyces*. Sin embargo, no pudimos encontrar entonces pruebas fisiológicas que nos hiciera asegurar que la función respecto a la regulación del desencadenamiento de la represión catabólica por hexoquinasas tuviera lugar también en *Candida utilis*.



## Introducción

**Tabla E.** Comparación de las afinidades de las hexoquinasas de *Candida utilis* con los datos bibliográficos para otras hexoquinasas.

levadura	sustratos				F/G	M/G
	glucosa Km (mM)	fructosa Km (mM)	manosa Km (mM)	ATP Km (mM)		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>						
HK PI	0.1	0.7	0.1	0.1	2-3	1
HK PII	0.1	0.9	0.4	0.2	1.3	0.3
GK	0.1-0.03	-	0.1	0.05-0.1	-	0.3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <sup>2</sup>						
HK 1	8.5	1.5	0.1	0.6	9.1	4.4
HK 2	0.1	1.5	0.07	0.4	1.7	2.4
<i>Pachysolen tannophilus</i> <sup>3</sup>						
HK A	0.3	2.3	-	-	1.5	-
HK B	-	-	-	-	3	-
<i>Schwanniomyces. occidentalis</i> <sup>4</sup>						
HK	0.55	7.3	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i> <sup>5</sup>						
HK	0.2	2.1	0.1	0.5	2.2	-
GK	0.2	300	-	0.6	0.5	-
<i>Candida tropicalis</i> <sup>6</sup>						
HK	0.3	2.2	-	-	1.8	-
GK	0.3	-	-	-	-	-
<i>Candida maltosa</i> <sup>4</sup>						
HK	0.2	-	-	-	1.5	-
<i>Candida utilis</i> <sup>7</sup>						
HK 1	0.2	3.4	0.05	0.2	1.3	0.2
HK 2	-	-	-	-	1-3	-
GK	0.2	-	0.3	0.5	-	0.1

<sup>1</sup> Datos de Maitra (1975); Barnard (1975); Lobo y Maitra (1977) y Fernández y col. (1985). <sup>2</sup> Datos de Petit y col. (1996). <sup>3</sup> Datos de Mc Cann y col. (1987). <sup>4</sup> En Mazón y col. (1975). <sup>5</sup> De Malhberg y col. (1985). <sup>6</sup> De Hirai y col. (1977). <sup>7</sup> De Espinel 1991.

## Objetivos

Como hemos expuesto en la Introducción, nuestro ánimo es descubrir los mecanismos fisiológicos que regulan la represión por glucosa en *Candida utilis*. Esto se concreta en estos objetivos:

1. Analizar la regulación fisiológica de la actividad hexoquinasa en nuestra levadura.
2. Determinar la función hexoquinasa en la regulación de la represión por glucosa para la toma de azúcares. Establecer las semejanzas y diferencias respecto al modelo de *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Estudiar la regulación ejercida por la velocidad de flujo metabólico en la actividad de ciertas enzimas implicadas en el consumo de azúcares.
4. Establecer la influencia del paso de transporte en la velocidad de consumo de glucosa.
5. Obtener, si fuera posible, mutantes desreprimidos para el consumo de sustratos glucolíticos. Caracterizar los mutantes desde el punto de vista fisiológico.
6. Establecer las diferencias en la regulación de consumo de fuentes de carbono diversas que se encuentren entre las cepas mutantes y la parental, con el fin de encontrar las etapas de control de represión con valor fisiológico.
7. Elaborar, a partir de los resultados de los objetivos anteriores, un modelo de control de represión en *Candida utilis*.

## **Material y Métodos**

En este capítulo se describe la metodología general utilizada durante la experimentación de esta Tesis Doctoral. Aquellos experimentos que requirieron material o métodos específicos serán descritos en los apartados correspondientes de Resultados.

## 2.1. Cepas utilizadas.

Las cepas de levadura utilizadas en los trabajos de la Tesis Doctoral fueron:

*Candida utilis* IGC 3092 (CBS 890) (CYC 1018).

*Candida utilis* SDM-1 (CYC 1135).

*Candida utilis* SDM-2 (CYC 1136).

*Candida utilis* SDM-9 (CYC 1137).

*Saccharomyces cerevisiae* CECT 1317 (CYC 1314).

Esta última cepa está extensamente caracterizada por la CECT: Aislada en el Hillman Hospital y recibida como *Saccharomyces carlsbergensis*. Carece del plásmido 2  $\mu$ m. Ha sido utilizada en estudios de represión catabólica por el grupo del Prof. Moreno (p. ej. en Fernández y col., 1985). Es auxótrofo para pantotenato, inositol y piridoxina. Es una cepa patentada en la Oficina Europea de Patentes, con el número 0060465A2.

Todas las cepas fueron depositadas y conservadas congeladas en viales en nitrógeno líquido en la *Complutensis Yeast Collection* en el Departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas.

## 2.2. Medios de cultivo y mantenimiento de cepas.

### 2.2.1. Medios de mantenimiento.

2.2.1.1. **General.** Las cepas fueron conservadas en tubos de agar inclinado con el medio YPD, con la siguiente composición.

Extracto de levadura	0.5% (p/v)
Peptona Universal M 66	0.5% (p/v)
Agar	1.7% (p/v)

Los componentes antes citados fueron obtenidos de la casa Merck. La fuente de carbono fue usualmente glucosa monohidrato, aunque se prepararon tubos conteniendo fructosa o maltosa. En todos los casos la concentración de la fuente de carbono fue 1 % (p/v).

2.2.1.2. **Selectivo para mutantes.** Se conservaron en placas con YPD-DOG, con una composición semejante al medio YPD, excepto en la fuente de carbono, que fue rafinosa 1 % (p/v) y 2-desoxiglucosa 0.2 % (p/v) de Sigma. La mezcla de fuentes azucaradas fueron esterilizadas por filtración, para prevenir la descomposición del análogo de glucosa, y añadidas al agar estéril una vez que este último había sido esterilizado en autoclave.

### 2.2.2. De crecimiento.

#### 2.2.2.1. Medio complejo YPD. Se utilizaron dos composiciones alternativas:

En la primera receta se utilizó:

Extracto de levadura	0.5 % (p/v)
Peptona Universal M-66	0.5 % (p/v)
Fuente de carbono	1 % (p/v)

La segunda variante fue:

Extracto de levadura Difco	1 % (p/v)
Bactopeptona Difco	2 % (p/v)
Fuente de carbono	2 % (p/v)

2.2.2.2. **Medio sintético K.** Descrito por van Uden (1967) y capaz de soportar crecimientos de levaduras sobre glucosa al 2 ó 3 %, compuesto de:

Medio base:

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	5 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5 g/l
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.13 g/l

Factores de crecimiento:

Biotina	0.01 g/l
Pantotenato de calcio	0.8 g/l
Inositol	40 g/l
Niacina	1.6 g/l
Piridoxina	1.6 g/l
Tiamina	1.6 g/l

Solución de oligoelementos A:

$\text{BO}_3\text{H}_3$	1 g/l
IK	0.2 g/l
$\text{MoO}_4\text{Na}_2$	0.4 g/l

Solución de oligoelementos B:

Antes de la disolución de las siguientes sales, el pH se ajustó a 3 mediante la adición de  $\text{ClH}$  1 mM. Durante la preparación de esta solución, el pH se mantuvo debajo de 3, para evitar la precipitación del cloruro de hierro. Los siguientes compuestos se

disolvieron secuencialmente, en el siguiente orden:

$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.08 g/l
$\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g/l
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.8 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.8 g/l
Fuente de carbono (x 10)	0.5 % (p/v)

El medio base se esterilizó en autoclave siempre que ello fue posible. Las tres últimas soluciones, además de la fuente de carbono, son esterilizadas por filtración y conservados a 4°C por separado.

El medio completo se compone, cuando fue utilizado en crecimientos en discontinuo de una mezcla de 1:0.0005:0.0005:0.0005 de medio base, factores de crecimiento, solución de oligoelementos A y solución de oligoelementos B. La fuente de carbono se diluye 10 veces en el medio resultante para tener la concentración final 0.5 %.

En el caso de crecimientos en continuo, la concentración de la fuente de carbono era de 0.4 % y la esterilización del medio completo (en cantidades de 20 l) era realizada mediante filtración a través de filtros Millipak 40 de 0.2 µm de tamaño de poro de Millipore acoplados a una bomba peristáltica. Para evitar la formación de espuma se adicionó al medio antiespumante de B. Braun-Biotech (C6d. 271385). Esta espuma es producida durante el crecimiento debido a la agitación y aireación requerida por el metabolismo oxidativo de *Candida utilis*, a pesar de la utilización de un medio sintético. En crecimientos en discontinuo no es necesario la adición de antiespumante, pues la producción de espuma ocurre una vez que se ha iniciado la fase estacionaria del crecimiento.

**2.2.2.3. Para selección y aislamiento de mutantes deficientes en actividad hexoquinasa.** Con la misma formulación que el medio K (apartado 2.2.2.2.), excepto que el medio base se ajustó a pH 5.5 con NaOH. La concentración de agar fue del 2% (p/v). Después de la esterilización y durante el enfriamiento se añadió la fuente de carbono y las soluciones A, B y de factores de crecimiento.

## 2.3 Métodos de crecimiento.

**2.3.1 En matraz.** En este caso, el volumen del medio suponía 1/5 del volumen total del matraz. Las levaduras fueron crecidas a 28°C, en una plancha de agitación a 250 rpm. Las levaduras eran preinoculadas hasta la fase exponencial del crecimiento con un medio que contenía una fuente de carbono similar a la utilizada en el experimento.

**2.3.2 En placas micropocillo.** Los medios de cultivo fueron pipeteados en placas micropocillos en volúmenes variables según el propósito del experimento. Se utilizaron 340 µl de medio/pocillo, en pocillos con capacidad para 350 µl, en placas cubiertas por una tapa para experimentos denominados de limitación de oxígeno y 230 µl en placas destapadas para medios sin limitación de oxígeno (puesto que se comprobó que las mayores tasas de

crecimiento se obtenían con volúmenes entre 200 y 240  $\mu$ l). Se realizaron los experimentos en incubadores-lectores de placas micropocillo Bioscreen C de Labsystems, ajustando la temperatura a 28°C (tras un período de calentamiento de 10 min), con agitación de 900 rpm en crecimientos de 48 h. Las lecturas de densidad óptica se realizaron a 600 nm, cada 30 min. Cada pocillo se inoculó con 10  $\mu$ l de un preinóculo crecido en matraz. Los datos de crecimiento fueron procesados en programas de hojas de cálculo y la tasa de crecimiento determinada en las primeras fases de crecimiento, puesto que a tiempos más avanzados existían problemas de evaporación y precipitación de la biomasa en el fondo del pocillo, que implicaban un descenso de la  $DO_{600}$ .

**2.3.3. En fermentador.** El aparato utilizado fue un INFORS HT 100, con una cubeta de 2 l, con agitación inferior. La aireación se procuró mediante venteo por una bomba Sirocco de 3 W de potencia. El aire era esterilizado por el paso a través de filtros Gelman de venteo. El circuito de aireación terminaba en un difusor situado en el fondo de la cubeta. El flujo de aire fue de 1 vvm, mediante ajuste del caudal con un rotámetro incorporado en el fermentador. La oxigenación y mezcla del medio se garantizó por agitación mecánica a 600 ó 500 rpm. El pH se mantuvo estable a  $4.5 \pm 0.1$  mediante la adición de KOH 0.85 N, a través de un controlador de pH que recogía la señal de una sonda de pH esterilizable en autoclave INGOLD 465-35-K9. La temperatura se ajustó a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por el paso de agua atemperada a través de una camisa externa a la cubeta. El control de temperatura se efectuaba a través de una sonda Pt 100 insertada en la cubeta.

Los muestreos se realizaron a través de un conducto metálico introducido en el medio.

Cuando los crecimientos fueron en discontinuo, el medio K base se esterilizó dentro del fermentador. Antes del inicio de la fermentación se adicionó los restantes componentes del medio, junto con el volumen de agua perdido en el proceso de esterolización (generalmente 50 ml/l de medio). En este caso el volumen de medio fue de 1 l.

En crecimientos en continuo, el medio estéril completo fue adicionado a la cubeta previamente estéril mediante una bomba peristáltica. El volumen final era de 850 ml. En este caso, con el fin de procurar una aireación efectiva, las palas de agitación se situaron a 1 cm y a 4 cm del fondo de la cubeta para obtener un buen grado de rotura de la burbuja de aire. La adición de medio fresco del reservóreo se efectuaba por goteo a través de una bomba peristáltica Gilson Minipuls II de 4 canales. El flujo se controlaba variando la velocidad de la bomba. Con la instalación en la bomba de un canal de neopreno AG-60 de Bio-Rad con una luz interior de 3.2 mm se consiguieron flujos mínimos de 25 ml/h. El volumen de medio en el fermentador se mantuvo constante, evacuando el exceso de medio con un canal de salida de medio situado por encima del nivel del vórtice de agitación del medio. El medio residual era almacenado en una botella de 10 l estéril a la salida del fermentador, que era reemplazada cuando se cambiaba la tasa de dilución del fermentador.

En todos los casos, la inoculación se realizó por jeringa con células preinoculadas en matraz a través de un septo en la parte superior de la cubeta.



## 2.4. Determinación de los parámetros de crecimiento.

Para crecimientos en discontinuo, se consideró que el crecimiento de las levaduras utilizadas se podían ajustar al modelo de crecimiento exponencial, que se expresa en la siguiente ecuación:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu_{\max} t} \quad (2.1)$$

Donde X es biomasa (generalmente expresada en g/l de levadura seca),  $X_0$  es la biomasa inicial,  $\mu_{\max}$  es la tasa máxima de crecimiento (expresada en  $h^{-1}$ ) y t es el tiempo en h.

Para la estimación de la biomasa, se utilizaron determinaciones de peso seco, tras ser recogidas y lavadas con agua destilada las muestras de levadura en filtros de 27 mm de diámetro con 0.45  $\mu m$  de tamaño de poro que fueron pesados después de permanecer al menos 24 h a 80°C. Alternativamente se midió la concentración de biomasa por densidad óptica a 620 nm ( $DO_{620}$ ), que fueron convertidas a peso seco mediante la ecuación obtenida de Leyva (1993):

$$X = -0.0624 + 0.525 DO_{620} \quad (2.2)$$

Los valores de  $DO_{620}$  utilizados para calcular X fueron entre 0.09 y 0.7, puesto que se comprobó que la medición de DO, puesto que se comprobó que es en este rango cuando la densidad óptica era proporcional a la biomasa. Cuando la densidad del cultivo era superior a 0.7, se efectuaron las diluciones necesarias con agua destilada hasta alcanzar el rango válido para la ecuación.

La estimación de  $\mu_{\max}$  se realizó por ajuste de los datos experimentales por regresiones exponenciales con el programa estadístico Statgraphics v. 5 ó 7.

A su vez, se estimó el rendimiento final del cultivo Y mediante el cálculo del incremento de biomasa que se producía por el consumo de  $S_0 - S$  cantidad de sustrato, donde  $S_0$  es la cantidad de sustrato inicial y S la concentración residual en g/l o mM.

La determinación de la cantidad residual de sustrato o metabolitos de la fermentación se hizo después de extraer 1 ml de muestra del medio, centrifugar a 3000 g durante 2 min. para sedimentar la biomasa contenida en la muestra. 300  $\mu l$  del sobrenadante resultante fueron guardados en congelación hasta el momento de los ensayos.

En crecimiento en continuo, se utilizaron dos abordajes distintos para ajustar los datos experimentales: el modelo de Monod y el de Pirt una vez alcanzado el estado estacionario. En crecimientos en continuo se considera que el crecimiento de un microorganismo es estable en cada tasa de dilución (estado estacionario), para cualquier parámetro fisiológico que se desee determinar, cuando el cultivo ha sido lavado al menos 4 veces. Se puede demostrar, que en estas condiciones, sólo el 0.015% de la población microbiana que se encuentre dentro del fermentador procede de biomasa anterior al establecimiento de las condiciones experimentales determinadas, con lo que la mayor parte de la biomasa presente en el quimiostato ha estado creciendo en las condiciones requeridas por el experimento. Se puede demostrar, a su vez, que en estado estacionario,  $\mu = D$ , donde D es la tasa de dilución en  $h^{-1}$ . Consideramos que se alcanzaba el estado estacionario cuando, para cada tasa de dilución utilizada, el fermentador se había lavado 4 veces, pues habíamos recogido al menos 4 volúmenes de fermentador (3.4 l) de acuerdo a una calibración previa de la bomba de alimentación. Por el desgaste del conducto de neopreno

en cada uno de los experimentos realizados, esta calibración se consideró como orientativa de la tasa de adición real de medio fresco al fermentador.

**Modelo de Monod (1950).** Requiere que el rendimiento sea constante a lo largo del crecimiento, que el microorganismo consuma el sustrato con una afinidad constante en cualquier condición y que cualquier cantidad de sustrato consumido provoque el crecimiento de la biomasa. La evolución de la biomasa y del sustrato se describen por estas ecuaciones, en estado estacionario:

$$X=Y \left( S_0 - \frac{K_s \cdot D}{\mu_{\max} - D} \right); \quad S = \frac{K_s \cdot D}{\mu_{\max} - D} \quad (2.3)$$

Donde  $K_s$  se define como la constante de afinidad (en mM). La tasa de consumo de S, es q, con unidades mmol S/(g·h) se calcula de la siguiente manera

$$q = \frac{D}{Y} \quad (2.4)$$

**Modelo de Pirt (1975).** Considera un nuevo parámetro, denominado m o tasa de mantenimiento expresado en mmol S/(g·h), con el que se cuantifica el consumo mínimo de sustrato necesario para que el microorganismo inicie el crecimiento, puesto que la célula necesita energía para el sostenimiento de funciones no necesariamente relacionadas con el crecimiento. Entre ellas se han reconocido el recambio de material celular, mantenimiento de gradientes osmóticos, motilidad, etc. El modelo se resume en las siguientes ecuaciones:

$$X = \frac{D \cdot Y_{\max} (S_0 - S)}{D + m \cdot Y_{\max}}; \quad S = \frac{(D - m \cdot Y_{\max}) K_s}{\mu_{\max} - m \cdot Y_{\max} - D} \quad (2.5)$$

Se introduce  $Y_{\max}$  como el rendimiento máximo, puesto que este modelo no presupone un rendimiento constante.

La tasa de consumo de sustrato máxima ( $q_m$ ) se estima por la expresión

$$q_{\max} = \frac{D}{Y_{\max}} + m \quad (2.6)$$

La estimación experimental de D, X y S, para ambos modelos utilizados, se realizó de la siguiente manera:

D se puede definir como la proporción de medio total en el fermentador que es lavado cada hora. De esta manera para nuestras condiciones de ensayo, D se calculó conociendo que el volumen del medio en el fermentador es 850 ml, el volumen almacenado en la botella de salida del medio residual y el tiempo utilizado en cada una de las diluciones ensayadas.

X y S se conocieron mediante muestreo directo en el fermentador, realizado de la siguiente manera. El medio es recogido después de provocar en la cubeta de fermentador una presión positiva mediante la oclusión del canal de salida de aire. El canal de muestreo fue lavado previamente a la toma de muestra haciendo pasar al menos 5 ml de medio por él. El volumen de medio utilizado para lavar el canal de muestreo no fue utilizado con fines experimentales. Cuando el muestreo se efectuaba para la determinación del sustrato o metabolitos de fermentación, se tomaba 5 ml que eran filtrados a través de filtros Millex

HA con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , como método de eliminación de células. El proceso duraba entorno a 3 s. De esta manera, se minimizaba la alteración del nivel de metabolitos existente dentro del fermentador debido a un metabolismo celular durante el tiempo de muestreo, como se discutirá posteriormente. La biomasa se obtenía con el mismo procedimiento experimental, omitiendo el paso de filtración.

## 2.5. Determinación de metabolitos y sustratos de fermentación.

### 2.5.1. Glucosa. Se utilizaron dos métodos enzimáticos.

**Por la reacción GOD-Perid.** Del equipo de análisis de Boehringer Mannheim (n° referencia 124 028), durante un tiempo de reacción de 50 min. a 25°C. Se realizaron distintas calibraciones según el rango de glucosa a detectar.

Se pudo determinar cantidades de glucosa entre 1.25 mg/l y 125 mg/l mezclando 300  $\mu\text{l}$  de muestra y 2 ml de solución enzimática. Determinándose la relación:

$$A_{610} = 8.041 \cdot 10^{-4} + 10.726 \left( \frac{\text{mg glucosa}}{\text{ml}} \right), \quad r = 0.999 \quad (2.7)$$

Para rangos de glucosa entre 20 mg/l y 1 g/l, se diluyó la muestra diez veces con agua destilada, para un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ , que se adicionaron a 2.5 ml de mezcla enzimática. Se encontró esta relación:

$$A_{620} = -2.199 \cdot 10^{-4} + 0.306 \frac{\text{g glucosa}}{l}, \quad r = 0.998 \quad (2.8)$$

**Por la reacción de la hexoquinasa.** Mediante análisis realizados en un Cobas Bio Autoanalyzer de Roche, determinándose el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la producción de NADPH (coeficiente de extinción  $\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). 10  $\mu\text{l}$  de muestra se mezcló con 100  $\mu\text{l}$  de una solución para la obtención de una línea base conteniendo:

Tampón Pipes 100 mM pH 7	2 ml
Agua destilada	1.28 ml
ATP 0.1 mM en tampón Pipes 100 mM pH 7	100 $\mu\text{l}$
NADP 0.1 M	80 $\mu\text{l}$
MgSO <sub>4</sub> 0.5M	80 $\mu\text{l}$

La reacción se inició añadiendo 125  $\mu\text{l}$  de una solución compuesta de:

Tampón Pipes 100 mM pH 7	400 $\mu\text{l}$
Hexoquinasa (Boehringer Mannheim)	5 $\mu\text{l}$
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Boehringer Mannheim)	5 $\mu\text{l}$

Se determinó la cinética de producción de NADPH durante y se analizó el incremento final de absorbancia tras transferir los datos a la hoja de cálculo Lotus 1.2.3.

Opcionalmente, se realizó la determinación de glucosa (y fructosa) mediante el protocolo propuesto por Boehringer Mannheim (equipo enzimático ref. 139 106)

**2.5.2. Disacáridos.** Se utilizaron dos métodos para la valoración de maltosa y sacarosa.

**Determinación de azúcares totales por el método del fenol.** (Herbert y col., 1971) Válido en un rango de concentraciones entre 10 y 100 mg/l. En tubos de boca ancha a 0.5 ml de muestra se añadió 0.5 ml de una solución fresca de fenol grado 5 % (p/v). Inmediatamente se añadió 2 ml de ácido sulfúrico concentrado con un pipeteo rápido, mientras se procuró una mezcla rápida por agitación en vórtex. Tras reposar 30 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 488 nm. Simultáneamente a la determinación de las muestras, se valoró una recta patrón que abarcaba el rango de medida, pues el desarrollo de color puede depender fuertemente de la velocidad de adición del ácido e intensidad de la agitación.

**Determinación enzimática de maltosa.** En soluciones que contenían maltosa, se diluyó 1:1 con tampón TEA 100 mM pH 7 y se añadió 2 U. de  $\alpha$ -glucosidasa (Boehringer Mannheim), incubándose durante 30 min a 37°C. La glucosa hidrolizada se determinó en el lector automático Cobas tras la reacción con hexoquinasa, con el método descrito previamente.

**2.5.3. Etanol.** Se utilizó el equipo enzimático de Boehringer Mannheim (nº referencia 176 290) con alcohol deshidrogenasa. Como variación al protocolo experimental propuesto por el fabricante, se disminuyó 3 veces todos los volúmenes de reactivos y muestra de la reacción. La determinación de etanol se realizó por la producción de NADH con estequiometría 1:1 con respecto al etanol. La concentración de etanol se valoró conociendo que  $\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

**2.5.4. Glicerol.** Se utilizó el equipo enzimático de Boehringer Mannheim (nº referencia 148 270). Al igual que en las valoraciones de etanol, los volúmenes de reactivo disminuyeron a un tercio respecto a las cantidades recomendadas por el fabricante. El glicerol se valoró extrapolando la cantidad de NAD producido por oxidación del NADH de la reacción.

**2.5.5. Ácido acético.** Determinado mediante el equipo enzimático de Boehringer Mannheim (nº referencia 148 261). El procedimiento de ensayo con cantidades de reactivo menores de lo recomendado fue semejante a las medidas de los metabolitos anteriores. El incremento de absorbancia a 340 por producción de NADH fue utilizado para conocer la concentración de acético de las muestras.

Finalmente otros metabolitos componentes de los medios de cultivo o producidos en la fermentación fueron valorados por equipos enzimáticos de Boehringer Mannheim.

**2.5.6. Intercambio de gases (oxígeno y CO<sub>2</sub>).** La tasa de consumo de oxígeno y producción de CO<sub>2</sub> se valoró por métodos respirométricos o polarográficos.

**Método respirométrico.** Se usó el método de Warburg directo (Umbreit) en 2 ml

de muestra de células tomadas directamente del medio de cultivo. En matraces utilizados para la determinación de  $O_2$ , en un pocillo separados del medio, se añadió una tira de papel impregnadas con 200  $\mu$ l de una solución de KOH 20 % (p/v). Las medidas de las variaciones de presión en los matraces se efectuaron a 28°C durante, al menos, 1 h.

**Método polarográfico.** Específico para el consumo de  $O_2$ . Muestras de células tomadas de cultivos, fueron lavadas con medio K sin fuente de carbono. En el momento del ensayo se diluyó 0.5 ml de células con 9 ml de medio K sin fuente de carbono para dar una concentración final de células de 100 mg/l en una cubeta de 10 ml termostatzada a 28°C. La muestra fue homogeneizada por agitación magnética durante todo el tiempo del experimento. La concentración de oxígeno, determinada en mg  $O_2$ /l, se efectuó mediante una sonda Orion 97-08-99 y la señal recogida en un pHmetro Mettler Delta 350. Para evitar el intercambio de oxígeno con la atmósfera el conjunto de muestra y sonda fue sellado con una junta tórica. De esta manera la señal de consumo del gas no se vio alterada por el aporte de nuevo gas disuelto procedente de la atmósfera. Durante los primeros 3 minutos de ensayo se recogió la tasa de respiración endógena de la muestra. El consumo de oxígeno por metabolismo de distintas concentraciones de glucosa fue seguido entre los 10 s y los 3 m siguientes a la adición de glucosa en un volumen de 0.5 ml.

## 2.6. Obtención de extractos enzimáticos y células permeabilizadas.

**2.6.1. Extractos enzimáticos.** En el caso de que se necesitaran extractos para la determinación de enzimas intracelulares, se tomaron muestras de células de los medios de cultivos que contenían suficiente cantidad de células para la experimentación. Se lavaron 2 veces con agua destilada a 4°C o en el tampón adecuado frío. Finalmente se resuspendieron en el tampón adecuado a una concentración aproximada de 100 mg/ml de peso húmedo, añadiéndose una mezcla consistente en EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y PMSF 1 mM (concentración final), para evitar la degradación enzimática. La muestra lavada y resuspendida se congeló a -20°C en eppendorfs o en tubos de 30 ml de fondo cónico, según el tamaño de la muestra. Como método de rotura de las células, se usaron bolas de vidrio (0.25-0.3  $\mu$ m de diámetro, de Sigma) previamente lavadas en el tampón adecuado. Las bolas se añadieron en una proporción 1:1 (v/v) a la muestra. Las células se rompieron por sucesivos ciclos de agitación en vórtex y reposo en hielo de 1 min cada uno, hasta alcanzar la descongelación de la muestra. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a 3000 g durante 10 min a 0°C, descartándose el residuo de biomasa y bolas de vidrio. El sobrenadante se utilizó como extracto libre de células y se repartió en eppendorfs en congelación hasta la determinación enzimática. Opcionalmente, el paso de centrifugación se realizó en eppendorfs a 3000 g durante un minuto en una microcentrifuga con el rotor previamente enfriado a -20°C, si los extractos resultantes iban a ser usados inmediatamente.

**2.6.2. Permeabilización.** A muestras de células lavadas y resuspendidas como se muestra en el punto 2.5.1., se les añadió una solución permeabilizante compuesta de etanol-tolueno a 4°C (4:1, v/v) en una cantidad de 1/10 del volumen de la muestra. Tras agitar en vórtex durante 3 min, el proceso de permeabilización se detuvo añadiendo 500  $\mu$ l de tampón a 0°C por ml de muestra. Las células permeabilizadas se lavaron con el tampón preciso mediante dos pasos de centrifugación a 3000 g, durante 1 ó 5 min a 0°C, según el

volumen de la muestra. Finalmente, las muestras se guardaron en congelación hasta su utilización. Este tratamiento no implica la pérdida de enzima por solubilización en el tampón, como se muestra en Espinel (1991).

**2.6.3. Extractos para la determinación de invertasa.** Se usó el medio de cultivo como extracto. las células fueron separadas del medio, tal como se indica en el apartado 2.4.

**2.7. Determinación de proteína o biomasa en ensayos enzimáticos.** Para la valoración de las actividades específicas, se cuantificó la cantidad de enzima presente en la reacción por dos métodos:

**Determinación de proteína.** Se utilizó el método de Bradford (1976), con el fin de evitar las interferencias que se podían registrar por las presencia de distintos compuestos que afectan a la sensibilidad de otros métodos de valoración de proteínas, como Lowry o *biuret*. El procedimiento, denominado microensayo, consistió en la incubación de 800  $\mu$ l de muestra con 200  $\mu$ l del reactivo sin diluir del equipo de Bio-Rad. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 595 nm de la muestra.

Los valores de absorbancia, se extrapolaron a una curva patrón de seroalbúmina bovina con la siguiente expresión:

$$A_{595} = 0.0103 + 0.0361 \frac{\mu\text{g proteína}}{\text{ml}} \quad (2.9)$$

Opcionalmente, para la determinación de proteínas en ensayos de consumo de azúcares, se utilizó el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

**Determinación de peso seco.** Muestras concentradas de células (50-100  $\mu$ l) fueron pipeteadas en porciones taradas de papel aluminio de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> de superficie y secadas en la estufa durante, al menos 24 h. En el caso de que la biomasa estuviera contenida en un tampón concentrado, se pipeteó la misma cantidad de tampón sin células para descontar el peso de las sales del tampón.

## 2.8. Determinación de actividades enzimáticas.

**2.8.1. Hexoquinasa.** Se utilizan los métodos de determinación enzimática de hexosas fosfatos o del ADP producido en la reacción (Hirai y col., 1977; Anderson y Sapico, 1975), ya usadas en Espinel (1991). En todos los casos, el tampón de reacción fue imidazol 50 mM con Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM. La reacción se determinó en las denominadas por nosotros **condiciones óptimas** (imidazol pH 8 y 30°C), de acuerdo a Espinel (1991), o **condiciones fisiológicas** (imidazol pH 7 y 28°C).

**Fosforilación de glucosa.** A una cantidad de muestra de 25 ó 10  $\mu$ l tamponada en el tampón de reacción sin Cl<sub>2</sub>Mg se añadió una mezcla de reacción preparada extemporáneamente en un volumen final de 1 ml, que contenía:

D-Glucosa (Merck)

25 ó 100 mM

---

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Tipo VII, Sigma)	1 U
NADP (n° referencia N 0505, Sigma)	1 mM
ATP (grado I, Sigma)	2 mM

La reacción se inició con la adición de ATP. La cinética de la reacción se leyó por la formación de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm. La correlación entre absorbancia y NADPH producido se calculó en el espectrofotómetro de acuerdo a la relación 1 unidad de  $A_{340}=159.84 \mu\text{mol NADPH}$ , determinada en las condiciones del ensayo con distintas concentraciones de NADPH.

**Fosforilación de fructosa.** En este caso el sustrato a fosforilar se sustituyó por fructosa (Merck) 25 ó 100 mM y a la mezcla de reacción se añadió 1 U de glucosa 6-fosfato isomerasa tipo III de Sigma.

**Fosforilación de manosa.** La reacción se siguió después de añadir a 10  $\mu\text{l}$  de muestra las siguientes soluciones:

ATP 80 mM	12.5 $\mu\text{l}$
Solución 1 (ATP 1.32 mM, NADH 0.9 mM, PEP 0.25 mM)	300 $\mu\text{l}$
Solución 2 (piruvato quinasa 1.8 U y lactato deshidrogenasa 1.6 U)	3 $\mu\text{l}$
Solución 3 (tampón de reacción, manosa y $\text{Cl}_2\text{Mg}$ en las mismas concentraciones finales que las descitas para la determinación de la fosforilación de glucosa y fructosa)	666 $\mu\text{l}$

La reacción se inició con la adición de muestra.

Las soluciones 1 y 2 fueron obtenidas del equipo enzimático de Boehringer Mannheim para la determinación de glicerol. La relación entre  $A_{340}$  y cofactor oxidado producido en la reacción se determinó con la fórmula experimental descrita anteriormente.

En todos los casos, independientemente del sustrato añadido, la velocidad de la reacción era proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

Las unidades de actividad enzimática se definieron con nmol de NADPH o NAD producidos por mg de proteína cada minuto.

**2.8.2.  $\alpha$ -glucosidasa.** Se determinó la actividad por la velocidad de hidrólisis del análogo de maltosa PNPG (Sigma) en células permeabilizadas y a 28°C, en un procedimiento variado de Peinado (1987).

Muestra	50 $\mu\text{l}$
Tampón fosfato de Sørensen 100 mM pH 6.5	850 $\mu\text{l}$
PNPG 20 mM	100 $\mu\text{l}$

La reacción se inició con la adición de PNPG y transcurrió hasta la aparición de color amarillo en la mezcla de reacción. En este momento, para parar la reacción, 200  $\mu\text{l}$  de muestra se pipetearon en 1 ml de carbonato sódico 5% (p/v). Las células fueron separadas por centrifugación (3000 g, durante 1 min). El PNP resultante de la hidrólisis se determinó espectrofotométricamente a 400 nm y sustitución del valor en una curva patrón

de PNP.

Se comprobó que la pendiente de la tasa de hidrólisis de PNPG era proporcional con el tiempo.

La unidad de actividad específica se definió como nmol de PNP producido por mg de proteína por minuto.

**2.8.3. Invertasa.** Se utilizó la glucosa libre aparecida por la hidrólisis de sacarosa, con este procedimiento:

Muestra	300 $\mu$ l
Tampón succinato 100 mM, pH 5.2 con sacarosa 200 mM	700 $\mu$ l

Transcurridos 0, 5 y 10 min las reacciones se pararon pipeteando 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción en 900  $\mu$ l de URAC (Boehringer Mannheim, n° de referencia 125 415) como solución desnaturalizante de proteínas. En el caso de que las muestras procedieran de medios con glucosa, se realizaron diluciones 1:10 de la muestra en tampón succinato 100 mM pH 5.2 sin sacarosa y el tiempo de reacción fue de 0, 15, 30 y 45 min. Las proteínas se precipitaron por centrifugación a 10000 g durante 1 min. El sobrenadante resultante se utilizó para la valoración de glucosa por el método del apartado 2.4.1.

Las concentraciones de glucosa procedentes del medio de cultivo se valoraron en muestras diluidas con URAC, que siguieron el mismo tratamiento que el expuesto anteriormente.

La unidad de actividad se definió como  $\mu$ mol glucosa producida por mg de proteína y minuto (en cultivos en discontinuo) o  $\mu$ mol de glucosa de hidrólisis por ml de medio en cultivo continuo.

#### 2.8.4. Alcohol deshidrogenasa.

Extracto crudo	10 $\mu$ l
Tampón $K_2HPO_4$ de Boehringer Mannheim pH 9 del equipo enzimático de referencia n° 176 290 con NAD 0.4 mM	900 $\mu$ l
Etanol 1M	100 $\mu$ l

La reacción se iniciaba con la adición de etanol. Se siguió la aparición de absorbancia a 340 nm, como indicador de la actividad enzimática.

La unidad de actividad se definió como  $\mu$ mol de NADH aparecido por mg de proteína por minuto.

**2.8.5. Transporte de glucosa.** Se utilizaron dos procedimientos distintos que nos permitieron distinguir la actividad transportadora del azúcar mediada por simporte de protones (Peinado y col., 1989) de la actividad debida a la difusión facilitada.

**2.8.5.1. Determinación del transporte activo.** Se utilizó un sistema pHmétrico para la valoración de los cambios de pH debidos al movimiento de protones generados en el transporte. Se estimó que la concentración de protones que desaparecían del medio de reacción era la misma que la cantidad de glucosa que era transportada dentro de la célula,



considerando la estequiometría 1:1 protón-glucosa establecida por Peinado y col. (1989).

En una cubeta de fondo cónico de 10 ml termostatizada a 28°C se introdujo 4.5 ml de células a una concentración 60-80 mg/ml peso seco, resuspendidas en agua destilada. Las células habían sido previamente desenergizadas tras permanecer en hielo entre 1 y 3 horas. La muestra fue oxigenada durante todo el desarrollo del experimento por agitación magnética. El valor inicial de pH se ajustó con HCl 10 mM o NaOH 40 mM hasta valores de 4.5 ó 5. Se registró la pendiente de basificación inicial del medio producida tras la adición de 9 µl de glucosa 10 mM (concentración final).

La toma de protones se cuantificó estimando el cambio de pH producido tras añadir al medio 100 nmol de protones, procedentes de HCl.

La posibilidad de registrar una falsa basificación debido a diferencia de pH entre la solución de glucosa y el medio que contenía las células se descartó experimentando con células de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Candida utilis* crecidas en glucosa, donde se ha comprobado la no existencia de este tipo de transporte.

**2.8.5.2. Transporte de glucosa radiactiva.** Se siguió el método de Walsh y col. (1994), con leves variaciones. Este método introduce cambios metodológicos respecto al método tradicional de Bisson y Fraenkel (1983b). Las células fueron recogidas por filtración, lavadas en tampón fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 4.5 y concentradas a un 5 % peso húmedo (p/v) y conservadas en hielo hasta su utilización.

Se preparó una batería de concentraciones de glucosa fría entre 0.4 y 243 mM, que sirvió para las distintas determinaciones del transporte y que fue guardada en congelación. La batería de glucosa marcada se preparó evaporando por flujo de aire entre 400 y 100 de glucosa marcada de Amersham (según Walsh y col., 1994). El residuo seco de glucosa radiactiva se diluyó en glucosa fría. La concentración real de glucosa se estimó por valoraciones en el analizador automático Cobas.

Las células fueron energizadas por burbujeo de aire durante 5 min, previos a la determinación. 50 µl de células fueron pipeteados dentro de eppendorfs que contenían 10 µl de diferentes concentraciones de [U]-glucosa. El tiempo de la reacción se cronometró, mientras las células y la glucosa eran mezcladas con sucesivos pipeteos. La media del tiempo de reacción fue de 5 s. La reacción se paró introduciendo 50 µl de la mezcla de reacción en 10 ml de tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 4.5 con glucosa no marcada 500 mM, enfriada a, al menos -6°C por inmersión en hielo con sal. Inmediatamente las células fueron separadas de la glucosa marcada por filtración. La glucosa retenida inespecíficamente por las células fue lavada 2 veces con el mismo tampón frío. Los filtros se recogieron e introdujeron rápidamente en viales conteniendo 8 ml de líquido de centelleo.

Paralelamente, se elaboraron los blancos introduciendo 10 µl de glucosa marcada en los tubos que contenían el tampón de parada de reacción, tras lo cual se pipeteó 50 µl de la solución de células. La mezcla fue inmediatamente filtrada y lavada como se ha expuesto previamente. La actividad específica de las muestras se determinaron por lecturas de radiactividad correspondientes a 10 µl de las soluciones de glucosa marcada pipeteadas en viales con 8 ml de líquidos de centelleo.

Debido a que la realización de los ensayos de transporte de glucosa en cada una en las series completas de concentraciones de glucosa duraba 18- 25 min, se tomaron muestras de células antes y después del experimento para la determinación de la concentración de

proteínas, con el fin de valorar el grado de evaporación de la muestra por el burbujeo. El valor final de proteína, para cada una de las determinaciones, se estimó tomando en cuenta esta concentración progresiva de la muestra.

Los parámetros cinéticos fueron calculados con la ayuda del programa informático Enz-fitter, si tomábamos en consideración un único sistema de transporte, y con programas de ajuste de regresión no lineal con el paquete estadístico Statgrafics v. 7.1

La unidad de transporte se definió, en ambos tipos de transporte, como nmol glucosa transportada por mg de proteína por minuto.

**2.8.6. Actividad fosfatasa de hexosas-fosfato.** Se determinó mediante métodos espectrofotométricos. En una mezcla de reacción que contenía los siguientes compuestos:

Tampón imidazol 50 mM, pH 7 con $\text{Cl}_2\text{Mg}$ 10 mM	850 $\mu\text{l}$
Glucosa-6-P (o fructosa-6-P) 10 mM x 10	100 $\mu\text{l}$
Extracto enzimático	50 $\mu\text{l}$

La reacción se iniciaba con el pipeteo del extracto. La temperatura de reacción fue de 28°C. Transcurrido un intervalo de tiempo, 100  $\mu\text{l}$  de muestra fueron pipeteadas dentro de un eppendorf con 100  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 10% (v/v). Los eppendorfs fueron conservados en congelación.

La determinación de la glucosa o fructosa libres, producidas en la reacción se efectuó mediante el equipo enzimático con HK de Boehringer Mannheim (ref. 139 106).

Cuando se pretendió averiguar la actividad fosfatasa con 2-desoxiglucosa-6-P, la metodología seguida fue la siguiente:

Tampón imidazol 50 mM, pH 7 con $\text{Cl}_2\text{Mg}$ 300 mM	850 $\mu\text{l}$
2-desoxiglucosa 200 mM	50 $\mu\text{l}$
ATP 250 mM	50 $\mu\text{l}$
HK PII de Boehringer Mannheim (ref. 1426 354)	50 $\mu\text{l}$

Se mantuvo la reacción a 25°C durante 20 min. La reacción se paró inactivando la hexoquinasa comercial por ebullición durante 5 min. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante utilizado como fuente de 2-desoxiglucosa-6-P.

Las reacciones de determinación constaban de los siguientes compuestos:

Tampón imidazol con 2-DOG-6-P	950 $\mu\text{l}$
Muestra enzimática	50 $\mu\text{l}$

La reacción se paró a tiempos determinados por la dilución 1:1 de alícuotas de la mezcla de reacción en una solución de ácido perclórico al 10% (v/v). La cantidad de 2-DOG liberada se determinó mediante la reacción de GOD-Perid. Las impurezas de 2-DOG sin el resto de fosfato que provenían de la reacción de HK se determinaron como control en ensayos sin muestra.

## 2.9. Obtención y selección de mutantes.

**2.9.1. Mutantes espontáneos desreprimidos.** Se utilizó el método general desarrollado por Zimmermann y Schell (1977), con el uso del análogo de glucosa 2-desoxiglucosa.

Se preparó un medio YPD con glucosa al 4 %, crecido hasta la fase exponencial ( $DO_{620} = 4$ ). Las células se centrifugaron y lavaron dos veces con agua fría a 0°C estéril. Se inocularon placas YPD-DOG (con rafinosa 1% (p/v) de Sigma, como fuente de carbono asimilable), donde la concentración de 2-desoxiglucosa fue de 0.05% ó 0.2% (p/v) con 100 µl de la solución de células. Se incubaron las placas durante 1 semana a 28°C. Se seleccionaron y transfirieron a placas YPD con glucosa 1% (p/v) o una mezcla de glucosa 1% (p/v)-maltosa 1% (p/v) las colonias producidas, para el análisis cualitativo de actividad  $\alpha$ -glucosidasa.

Este análisis consistió en tomar por frotamiento la colonia resultante después de 24 h de incubación en medio YPD sobre una placa de vidrio. La colonia fue permeabilizada por inmersión en una gota de 50 µl de tolueno. Una vez evaporado el tolueno se añadió a la muestra 100 µl de tampón fosfato de Sørensen 0.1 M, pH 6.5 y 50 µl de PNPG 20 mM. Se esperó hasta la aparición de color amarillo, comparándose el tiempo requerido con una muestra de la cepa *Candida utilis* IGC 3092, crecida de forma similar a los presuntos mutantes seleccionados.

La pérdida de actividad enzimática debida al tratamiento permeabilizante se descartó al comprobarse que aparecía color amarillo antes de pasar 3 min después de la adición del sustrato en muestras de la cepa salvaje con la enzima inducida en un medio YPD con maltosa 1% (p/v).

Aquellas cepas que desarrollaron color procedentes de cultivos en placa con glucosa o/y glucosa-maltosa, fueron consideradas presuntos mutantes desreprimidos.

**2.9.2. Aislamiento y selección de mutantes químicamente inducidos.** Se utilizó EMS, como agente alquilante para el tratamiento mutagénico (Spencer y Spencer, 1988; Gancedo y col., 1991). Células crecidas en medio YPD con glucosa 4 % (p/v) en fase estacionaria, fueron divididas en porciones de 10 ml, lavadas, concentradas y resuspendidas en 1.5 ml de tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7. A la mitad de las muestras se les añadió 5 µl de una solución de EMS (50 µl/ml) y, a la otra mitad, igual volumen de EMS diluído (5 µl/ml). Se incubó a 28°C y se tomaron muestras entre 1 y 70 min después de la adición del mutágeno. Cada muestra de 100 µl, fue disuelta en 8 ml de tiosulfato de sodio al 5% (p/v). Placas YPD con glucosa 1% (p/v) se inocularon con 100 µl de esta solución.

Aquellas colonias supervivientes al tratamiento fueron transferidas por contacto de placa a placas YPD con rafinosa 1% (p/v) más 2-desoxiglucosa 0.2% (p/v). Aquellas colonias de mas de 1 mm aparecidas después de una semana de incubación, fueron seleccionadas para la realización del ensayo cualitativo de actividad  $\alpha$ -glucosidasa, como se describe en el apartado 2.8.1. Se comprobó que después de 1 h de tratamiento con EMS, la cantidad de supervivientes en medio YPD con glucosa 1% (p/v) era de alrededor de  $2 \cdot 10^3$  u.f.c./ml.

**2.9.3. Aislamiento y selección de mutantes con actividad hexoquinasa defectiva o disminuida.** Con este fin se ensayaron distintos métodos:

**Selección de mutantes espontáneos mediante nistatina.**

**Método A.** Se creció hasta la fase exponencial ( $DO_{620}=1.3$ ) un cultivo de glucosa 0.5% (p/v). Las células fueron lavadas en esterilidad y transferidas a un matraz con 400 ml de fructosa 0.5% (p/v) y nistatina (130 U/ml), para eliminar las células capaces de crecer sobre el azúcar. La nistatina había sido previamente disuelta en una solución madre con 1 ml de etanol y 1 ml de metanol. El volumen de solución madre de nistatina añadido a los medios, no superó el 0.4% del volumen de éstos. Se tomaron muestras de 100 ml, a las 3.5, 5 y 7 h de la transferencia al medio con fructosa-nistatina, que fueron lavadas con agua y concentradas en un volumen de 10 ml. Muestras de 100  $\mu$ l se inocularon en placas YPD con glucosa 0.5% (p/v). Las colonias finalmente obtenidas fueron examinadas en su actividad hexoquinasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

**Método B.** Cultivos crecidos en glucosa 0.5% hasta las 48 h de fase estacionaria, se lavaron y transfirieron a 400 ml de un medio de fructosa 0.5%. Después de 3 h de la transferencia y comprobado que se había reiniciado el crecimiento ( $DO_{620}=1$ ), se añadió nistatina (130 U/ml). Después de 3 h de la adición de la nistatina, se tomaron muestras de 100 ml que fueron tratadas como se comenta en el método A.

**Método C.** El procedimiento fue similar al descrito en el método B, con la salvedad de que el medio original de crecimiento en glucosa fue preparado con 0.4 g/l de sulfato amónico como fuente de nitrógeno, para aumentar la tasa de autodigestión y mutación espontánea. El método B y C terminaron con la inoculación de las muestras en placas agar-K (apartado 2.2.2.3.).

**2.10. Identificación sistemática de levaduras.** Se realizó de acuerdo a los criterios de clasificación fisiológica de Barnett y col. (1990), especialmente realizada en función de las características nutricionales de las levaduras.

De acuerdo a los autores, las llamadas **pruebas de crecimiento aeróbico** o de **asimilación**, se realizaron con 5 ml de medio *Bacto Yeast Nitrogen Base* YNB de Difco, con distintas fuentes de crecimiento, en incubaciones a 28°C en tubos de 16 mm de diámetro interno, inclinados. Los resultados de turbidez en la escala de Wickerham, leyendo las líneas oscuras en un cartón blanco situado detrás del tubo, se determinaron a los 3, 7, 14 y 21 días de la inoculación. Si el resultado en escala Wickerham es +2 ó +3 al séptimo día, el resultado se consideró positivo (+). Resultado retrasado (D), se consideró si esta turbidez se alcanzó entre los días 14 y 21. La ausencia de crecimiento se clasificó como negativo (-). Las concentraciones de las fuentes de carbono fueron del 1% (p/v), excepto en el caso de la rafinosa que fue del 2% y en ensayos con alcoholes (concentración del 0.5%). Las determinaciones de pruebas de fuentes de nitrógeno se realizaron en medios *Yeast Carbon Base*, YCB de Difco. El crecimiento visible, en 4 días, se consideró +. El crecimiento escaso en este tiempo se anotó como débil (W). Los crecimiento para la valoración de los requerimientos de vitaminas se realizaron como las pruebas de fuentes de carbono, leyéndose los resultados a los 3 y 7 días de la inoculación. Crecimientos +2 y +3 si fueron alcanzados en los primeros 7 días se consideraron +; si se llegaba después,

la valoración es D. El crecimiento a diferentes temperaturas se hizo con agar *Yeast Morphology Agar*, YMA con glucosa durante 3 días.

Las pruebas correspondientes a crecimientos sobre arabitol, 2-ceto-D-gluconato, 5-ceto-D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, metanol, 1,2-propanodiol y 2,3-propanodiol (como fuentes de carbono) y glucosamina e imidazol como fuentes de nitrógeno, no fueron realizadas pues la información que arrojan respecto a la clasificación de la levaduras no se considera determinante o es redundante, según la experiencia del CYC.

Las denominadas **pruebas de fermentación** se realizaron en tubos de 15 cm de largo y 12 de diámetro, con campanas Durham introducidas invertidas. Los tubos se rellenaron con 10-15 ml de caldo YNB con azul de bromotimol y con 2% (p/v) del azúcar y 4% (p/v) en el caso de la rafinosa. Los tubos se incubaron a 28°C, durante 3 semanas y se determinó la presencia de gas retenido en las campanas Durham de forma diaria durante la primera semana. Se consideró +. la presencia de gas en la burbuja.

Las pruebas de fermentación de inulina, almidón y D-xilosa no fueron realizadas, por el mismo motivo que el expuesto en las pruebas de crecimiento.

Tampoco fue necesario la realización de la prueba de azul de diazonio, para la distinción de basidiomicetos, al ser indicativa de esta clasificación otras pruebas realizadas alternativamente, como la de la hidrólisis de la urea. Para la realización de esta última prueba, se utilizó placas de YMA con rojo fenol como indicador de pH y urea. La hidrólisis de este compuesto se reveló por cambios del color del indicador a rojo.

Los crecimientos en presencia de cicloheximida se realizaron en YNB con glucosa, como en los medios de asimilación.

Para la determinación de los requerimientos de vitaminas, se utilizó el medio *Vitamin-free base*, VFB, carece de L-asparagina y de los factores de crecimiento ácido p-aminobenzoico, biotina, ácido fólico, myo-inositol, ácido nicotínico, pantotenato de calcio, piridoxina-HCl, riboflavina y tiamina-HCl.

La presencia o ausencia de pseudohifas se comprobó en microcultivos en placas de Dalmau con agar *Corn-meal*.

Durante la realización de las pruebas, las levaduras fueron mantenidas en agar malta.

Los resultados obtenidos en las tablas de clasificación fueron introducidos como respuestas con valor + o - en el programa de identificación de levaduras. Aquellas pruebas que resultaron dudosas se introdujeron con valor ?.

## 2.11. Extracción y análisis de metabolitos internos.

**2.11.1 Extracción.** Se utilizó el protocolo de de Koning y van Dam (1992). Se crecieron células en medio YPD, hasta la fase exponencial ( $DO_{620}=1.5$ ). Se filtraron y lavaron en tampón  $KH_2PO_4$  100 mM, pH 4.5 a una concentración de 5% de peso húmedo. Las células se mantuvieron en hielo durante 2 h. Para la realización del experimento, se incubó 55 ml de la suspensión de células en una cubeta termostatzada a 28°C, con agitación magnética como método de energización de la levadura y aireación. A tiempo 0, se pulsó 5 ml de glucosa, para dar una concentración final del azúcar de 20 mM. Se tomaron 5 ml de células como muestra a intervalos de tiempo, siendo el primero a los 5s.

Las muestras fueron pipeteadas y mezcladas rápidamente, para evitar la congelación de las células, en tubos conteniendo metanol al 60%, enfriado a  $-40^{\circ}\text{C}$ , en un baño de circulación de metanol, con el fin de parar el metabolismo. Una vez que la muestra mezclada en etanol, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm a temperaturas no superiores a  $-10^{\circ}\text{C}$ . El precipitado de células fue resuspendido en 2.5 ml de metanol 100% a  $-40^{\circ}\text{C}$ , al que se añadió 1 ml de cloroformo, mezclándose fuertemente hasta la homogeneización.

La extracción se consiguió con el siguiente procedimiento descrito: Se añadió 4 ml de cloroformo frío a  $-40^{\circ}\text{C}$  y 2 ml de tampón Pipes 3mM, pH 7.2, que contenía EDTA 3 mM a  $0^{\circ}\text{C}$ . Durante el pipetoe del tampón, las muestras fueron agitadas vigorosamente en vórtex, para prevenir la congelación del tampón. La mezcla fue agitada durante 45 min en un criostato ( $-35^{\circ}\text{C}$ ), tras lo cual, se centrifugó a 2000 rpm durante 20 min ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). El líquido situado encima de la película de restos celulares, que contenía el tampón y los metabolitos extraídos, se recogieron mediante una bomba de vacío en un tubo preenfriado a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Se añadieron 2 ml de metanol 100% al resto del tubo centrifugado con los restos celulares y el cloroformo, agitando en el vórtex para evitar la congelación. Se adicionó 2 ml de tampón Pipes con EDTA, mientras se agitó la mezcla fuertemente de forma manual durante 30s. Se repitió el último paso de centrifugación y de nuevo la capa superior se extrajo y se adicionó a la mezcla tampón metabolitos recolectada previamente.

Los metabolitos extraídos fueron concentrados por liofilización a baja temperatura a un volumen final de alrededor de 1 ml, requiriéndose unas 4 h en el proceso. Se estimó el volumen exacto por peso. Las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La concentraciones de metabolitos fueron valoradas en el analizador automático Cobas.

**2.11.2. Valoración de metabolitos intracelulares.** Se utilizaron determinaciones enzimáticas asociadas a la producción o consumo de NAD(P)H que pudo ser cuantificada por incrementos en absorbancia a 340 nm. Las reacciones enzimáticas necesarias para la determinación de los metabolitos fueron realizadas esencialmente según lo descrito por Bergmeyer (1985a y b). Las cinéticas de las reacciones se realizaron en el analizador automático Cobas.

La concentración intracelular de metabolitos se estimó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$CI = \left(\frac{1000}{6.3}\right) \cdot \left(\frac{250}{V_m}\right) \cdot \left(\frac{V}{5\text{ ml}}\right) \cdot \frac{1}{\text{mg proteína}} \quad (2.10)$$

Siendo CI, la concentración interna en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína. La fracción 1000/6.3 toma en consideración el coeficiente de extinción molar de NAD(P)H.  $V_m$  es el volumen de muestra introducida en las mezclas de reacción en ml y 250 la dilución de la muestra en la mezcla de reacción. V es el volumen final de la muestra (en ml) que contiene los metabolitos, una vez que ha sido tratada por liofilización; así V/5 ml es la razón de concentración de la muestra con el volumen original de ésta.

#### **Determinación de glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato y ATP.**

Reactivos (solución madre), 125  $\mu\text{l}$  de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

---

Tampón TEA 200 mM, pH 7.6	2 ml
NADP 40 mg/ml	80 µl
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	80 µl
Agua destilada	1.38 ml

Para determinar glucosa 6-fosfato (en un rango 0.02-4 mM):

G6P DH (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x100)	10 µl
-------------------------------------	-------

Para determinar fructosa 6-fosfato (en un rango 0.01-1 mM):

PGI (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x50)	10 µl
---------------------------------	-------

Para determinar ATP (en un rango 0.02-5 mM):

HK (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x50 con glucosa 10 mM)	10 µl
--	-------

### **Determinación de piruvato, PEP, 2PGA, 3PGA.**

Reactivos (solución madre), 125 µl de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

Tampón TEA 200 mM, pH 7.6	2 ml
NADP 15 mM	80 µl
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	80 µl
Agua destilada	1.38 ml

Para determinar piruvato (en un rango 0.1-10 mM):

LDH (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x100)	10 µl
----------------------------------	-------

Para determinar PEP (en un rango 0.005-0.5 mM):

PK (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x50 con ADP 20 mM)	10 µl
--	-------

Para determinar 2PGA (en un rango 0.005-0.2 mM):

Enolasa (10 mg/ml de TEA pH 7.6 x25)	10 µl
--------------------------------------	-------

Para determinar 3PGA (en un rango 0.05-2 mM):

PGM (5 mg/ml de TEA pH 7.6 con 1 mM 2,3-PGA)	10 µl
--	-------

### **Determinación de G3P, glicerol.**

Reactivos (solución madre), 125 µl de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

Tampón glicina 0.4 M, pH 9.8 con hidrazina 2 M	2 ml
NAD 40 mg/ml	120 µl
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	12 µl
ATP 0.1 M	80 µl
Agua destilada	1.308 ml

Para determinar G3P (0-3 mM):

G3P DH (10 mg/ml de glicina pH 9.8 x10)	10 µl
---	-------

Para determinar glicerol (0-30 mM):

GK (5 mg/ml de glicina pH 9.8 x10)	10 µl
------------------------------------	-------

### **Determinación de piruvato, ADP, AMP.**

Reactivos (solución madre), 125 µl de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

---

Tampón TEA 200 mM pH 7.6	2 ml
NADH 15 mM	80 µl
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	80 µl
Agua destilada	1.88 ml
KCl 1 M	800 µl

Para determinar piruvato (en un rango 0.1-10 mM):

LDH (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x100)	10 µl
----------------------------------	-------

Para determinar ADP (en un rango 0.5-4 mM):

PK (5 mg/ml de TEA pH 7.6 con 10 mM PEP)	10 µl
--	-------

Para determinar AMP (en un rango 0.02-4 mM):

Mioquinasa (10 mg/ml en TEA pH 7.6 con 5 mM ATP)	10 µl
--	-------

### **Determinación de DHAP, GAP, FBP.**

Reactivos (solución madre), 125 µl de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

Tampón TEA 200 mM pH 7.6	2 ml
--------------------------	------

NADH 15 mM	80 µl
------------	-------

Agua destilada	1.38 ml
----------------	---------

Para determinar DHAP (en un rango 0.05-2 mM):

G3P DH (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x100)	10 µl
-------------------------------------	-------

Para determinar GAP (en un rango 0.002-0.01 mM):

TPI (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x100)	10 µl
----------------------------------	-------

Para determinar FBP (en un rango 0.02-10 mM):

Aldolasa (5 mg/ml de TEA pH 7.6 x25)	10 µl
--------------------------------------	-------

### **Determinación NADH.**

Reactivos (solución madre), 125 µl de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

Tampón TEA 200 mM pH 7.6	2 ml
--------------------------	------

DHAP 100 mM	40 µl
-------------	-------

Agua destilada	1.96 ml
----------------	---------

Para determinar de NADH (en un rango 0-1 mM) se añadió:

G3P DH (10 mg/ml en TEA pH 7.6 x200)	10 µl
--------------------------------------	-------

### **Determinación de NAD.**

Reactivos (solución madre), 125 µl de volumen en la mezcla de reacción para la determinación de la línea base:

Tampón Sigma para la valoración de etanol	2 ml
---	------

Etanol 96%	40 µl
------------	-------

Agua destilada	1.96 ml
----------------	---------

Para determinar NAD (en un rango 1-2 mM):

ADH (1 mg/ml en tampón Sigma)	10 µl
-------------------------------	-------



## 2.12. Técnicas cromatográficas.

Se realizaron cromatogramas a partir de extractos crudos suspendidos en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.2 con EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y PMSF 1 mM y dializados durante 24 h en el mismo tampón. La temperatura de trabajo fue de 4°C.

Las columnas utilizadas contenían la resina preempaquetada en un volumen de 5 ml. Los gradientes utilizados fueron lineales de 20 ó 40 ml:

**Econo Pac HTP** (de Bio-Rad, n° referencia 732 0081). Contenía hidroxipatito como resina. Las características de estas columnas para la separación de distintos tipos de proteínas y, en especial de hexoquinasas, se pueden encontrar en Gorbunoff (1990) y Gancedo y col. (1977) y ha sido utilizada con éxito por nosotros (Espinel, 1991). La columna se equilibró con 3 volúmenes de tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 7.2. El volumen de la muestra fue de 500  $\mu$ l, conteniendo 1-4 mg de proteínas. La proteína no retenida se eluyó mediante el paso de 2 volúmenes del tampón de lavado. Las proteínas retenidas se eluyeron al acoplar un gradiente de tampón fosfato de sodio 5-300 mM. La columna se lavaba, tras el proceso cromatográfico con el mismo tampón a una concentración de 400 mM a temperatura ambiente. Los flujos de tampones en la columna fueron los recomendados por el fabricante.

**Econo Pac Blue** (de Bio-Rad, n° referencia 732 0035). Con Cibacron Blue 3G-A. Las resinas se equilibraron con el paso de 2 volúmenes de columna de tampón Tris-HCl 50 ó 10 mM, con EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  5 mM ajustado a pH 7.2 u 8. Las columnas fueron cargadas con 500  $\mu$ l de una solución (1-4 mg proteína) y lavadas con 2 volúmenes de tampón antes de que la proteínas retenidas fueran eluidas mediante distintos gradientes:

- 1) Gradiente creciente lineal de NaCl (0-1 M) y decreciente de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  de 5 a 0 mM.
- 2) Gradiente creciente lineal de NaCl (0-1.4 M) y decreciente de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  de 5 a 0 mM.
- 3) Creciente de glucosa entre 0 y 0.5 M.
- 4) Creciente de fructosa entre 0 y 0.5 M.
- 5) Creciente de ATP entre 0 y 20 mM con un incremento paralelo de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  entre 5 y 30 mM.

Los flujos fijados durante los distintos pasos cromatográficos se ajustaron a las recomendaciones del fabricante.

**Econo Pac DEAE Blue** (de Bio-Rad, n° referencia 732 0031). Con DEAE y Cibacron Blue 3G-A como agentes discriminantes. Los procedimientos experimentales fueron semejantes a la resina descrita anteriormente, a los que se añadió un sexto procedimiento:

Equilibrado de la columna con tampón a pH 7.2, con una concentración de Tris de 10 mM, seguida de un lavado con 1 volumen de columna con el mismo tampón al que se

añadió glucosa 0.5 M. Finalmente se corrió un gradiente creciente de NaCl 0-1.4 M y decreciente de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  5-0 mM.

En todos los casos, se recogieron fracciones de 2.5 ml, excepto las correspondientes a los pasos de los gradientes, donde se recolectaron 1 ml/fracción.

La actividad hexoquinasa fue localizada, en aquellas fracciones que la contenían, mediante un método *de visu* con el método descrito en el apartado 2.7.1. utilizando glucosa como sustrato. En la mezcla de reacción se añadió, además, PMS 0.3 mM y MTT 0.7 mM, que procuraban el desarrollo de color azul en aquellas fracciones con la actividad buscada (Entian y Frölich, 1984b; Espinel, 1991). Aquellas fracciones que presentaban color azul antes de transcurrir 10 m fueron guardadas en congelación y la actividad hexoquinasa determinada por producción de NADPH, a partir de la fosforilación de glucosa o fructosa, como se explica en el apartado 2.7.1.

### 2.13. Técnicas electroforéticas.

Se realizaron electroforesis con proteína no desnaturalizada, para la visualización de bandas de hexoquinasas, con un procedimiento experimental basado fundamentalmente en Maitra y Lobo, (1977); Entian y Frölich, (1984b); Mc Cann y col., (1987) y Espinel, (1991).

Se prepararon geles de electroforesis preparados con acrilamida 12% (p/v), cargados con 10  $\mu\text{l}$  de muestra en cada pocillo que fueron corridos en un equipo de electroforesis Mini Protean II, de Bio-Rad con una fuente de alimentación EPS 500/400 de Pharmacia durante 90 min, a un voltaje constante de 95 V y 4°C. Terminada la electroforesis, al gel se le sobrepone otro gel, denominado **de revelado**, preparado de la siguiente manera:

Se inyectó en un soporte de geles, atemperado a 60°C, 10 ml de una solución de agarosa al 1% (p/v) en tampón imidazol 0.1 M, pH 8 a 95°C. Una vez enfriado el gel, se embebió en una solución de 20 ml de tampón imidazol 0.1 M, pH 8 con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  30 mM, glucosa 50 mM. Finalmente se añadió en oscuridad 500  $\mu\text{l}$  de una solución madre de MTT y PMS, dando una molaridad final 0.7 mM de MTT y 0.3 mM de PMS. La mezcla se mantuvo a 4°C en oscuridad. Se eliminó el exceso de tampón en el momento de que el gel de revelado fue utilizado.

Entre el gel de electroforesis y el de revelado se deslizó 100  $\mu\text{l}$  de NADP 40 mM, 100  $\mu\text{l}$  de ATP 80 mM y 5 U de G6P DH. Se atemperó los geles a 25°C y en oscuridad para prevenir la reducción espontánea de los reactivos. Se esperó hasta la aparición de color azul sobre las bandas de las enzimas fosforilantes de hexosas (generalmente 10 min). Los reactivos no reducidos y enzimas utilizadas para el desarrollo del color fueron eliminados por lavados repetidos del gel revelador en agua destilada.

Todos los ensayos enzimáticos o para la determinación de cualquier parámetro, se realizaron en, al menos, 2 oportunidades independientes. Las curvas de crecimiento mostradas en la memoria de la Tesis, son reproducciones de crecimientos típicos en

---

discontinuo conseguidos después de efectuar, al menos 3 veces los experimentos. En el caso de los ensayos de consumo de mezcla de fuentes de carbono, las repeticiones del experimento fueron entre 4 y 8.

Los análisis estadísticos realizados, se efectuaron mediante regresión lineal o no lineal (por ajuste de los parámetros mediante el procedimiento de Marquart). Los paquetes informáticos utilizados fueron, en general, lo comunes en el mercado.

## **Resultados y Discusión**

### 3.1. Caracterización de las enzimas fosforilantes de hexosas en *Candida utilis*

Completamos el abordaje experimental realizado durante la realización del Trabajo de Tesina de Licenciatura (Espinel, 1991), que abarcó la caracterización bioquímica de dichas enzimas en nuestra levadura en crecimientos sobre glucosa. De dicho trabajo, concluimos que *Candida utilis* posee dos hexoquinas capaces de fosforilar fructosa, glucosa y manosa y una glucoquinasa con afinidad para estos últimos sustratos.

#### 3.1.1. Caracterización de los parámetros cinéticos de la fosforilación de hexosas en condiciones fisiológicas.

Los trabajos previos se realizaron en condiciones experimentales fijadas para el entorno ambiental de funcionamiento óptimo de las enzimas. Estas fueron fijadas a pH 8 y 30°C de temperatura (Espinel, 1991). En este caso, afrontamos el estudio en las condiciones que nosotros hemos llamado fisiológicas, donde el pH en la determinación de la actividad fue de 7 y la temperatura de 28°C, elegida al ser ésta a la que se realiza el crecimiento de la biomasa.

Los sustratos ensayados, fueron aquellos frente a los cuales estas enzimas tienen afinidad en ambientes naturales: fructosa, glucosa, manosa y ATP, como cosustrato necesario para la actividad de las enzimas (Maitra, 1970; Barnard, 1975).

Como fuente de proteínas se utilizaron extractos crudos de células y células permeabilizadas. La interpretación de los resultados obtenidos respecto al comportamiento cinético no diferieron con ninguno de los dos métodos utilizados. Tan solo el parámetro de  $V_{max}$  fue más reducido al utilizar células permeabilizadas, debido al mayor contenido en proteínas de las muestras.

Con el fin de determinar la constante cinética  $K_m$ , se procedió a la utilización de distintos métodos de ajuste. Método de ajuste no lineal en la representación directa  $v$  frente a  $S$  y método de ajuste por regresión lineal y no lineal en la representación de Eadie-Hofstee.

Tal como puede predecirse de los resultados con las fracciones enzimáticas aisladas (Espinel, 1991), los resultados podían ajustarse a un modelo con un único sistema fosforilante o varios con  $K_m$  parecidas, puesto que las  $K_m$  deducidas para la HK 1 y para la GK, como enzimas encargadas del 96% de la capacidad de fosforilación total de *Candida utilis*, fueron semejantes cuando se utilizó como sustrato la glucosa. En este caso la actividad total ( $v_T$ ), asumiendo el modelo de saturación, puede ajustarse a las siguientes ecuaciones:

$$v_T = \sum \frac{V_{max_i} \cdot S}{K_{m_i} + S} \quad (3.1)$$

Si las diferentes enzimas comparten valores semejantes para la afinidad por un sustrato, entonces la expresión queda reducida a:

$$v_T = \sum V_{max_i} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (3.2)$$

De forma que la actividad total  $V_T$  resulta la suma de cada una de las velocidades

que participan en la fosforilación de las hexosas a cada concentración de sustrato.

Los resultados se muestran en las Fig. 1. Las constantes cinéticas deducidas con los distintos métodos de ajuste se muestran en la **Tabla I**.

**Tabla I.** Parámetros cinéticos de la actividad hexoquinasa total de la cepa 3092, determinados mediante distintos procedimientos de ajuste<sup>1</sup>.

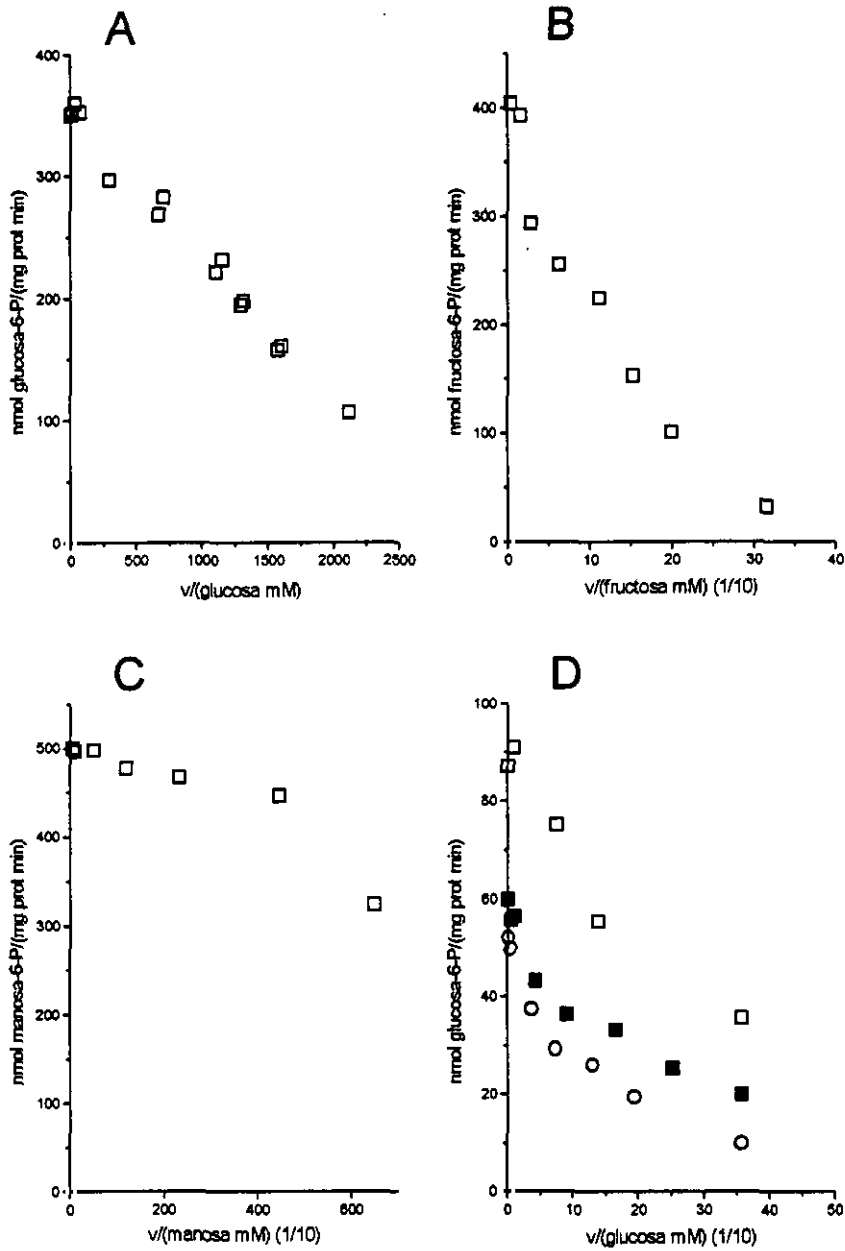
sustrato	ajuste no lineal Michaelis-Menten			ajuste lineal Eadie-Hofstee			ajuste no lineal Eadie-Hofstee		
	Km	Vmax	r <sup>2</sup>	Km	Vmax	r <sup>2</sup>	Km	Vmax	r <sup>2</sup>
<b>glucosa</b>	0.12± 0.00	354± 4.03	0.99	0.12 ±0.00	353± 5.3	0.99	-	-	-
<b>fructosa</b>	1.74± 0.31	395± 17.6	0.98	1.47± 0.21	389± 15.6	0.97	N.A.	N.A.	N.A.
<b>manosa</b>	0.02± 0.00	507± 10.4	0.99	0.01± 0.00	498± 2.8	0.98	-	-	-
<b>ATP</b>	0.55± 0.05	-	0.99	0.55± 0.05	-	0.99	-	-	-

<sup>1</sup> Unidades: Km en mM, Vmax en nmol/(mg proteína·min). El símbolo -, indica no determinado; N.A.: no ajustable.

Cuando se utilizó fructosa, aunque las cinética se ajustaron peor al supuesto de un sistema fosforilante, no se consiguió modelizar los resultados a dos sistemas de fosforilación. De nuevo el resultado era esperado, pues la enzima mayoritaria capaz de fosforilar fructosa es la HK 1. Esta enzima contiene más del 90% de la actividad fosforilante de fructosa. Independientemente de los valores cinéticos de la HK 2, la mayor parte de fructosa es utilizada por la enzima mayoritaria y la cinética de saturación obtenida necesariamente será muy parecida a la de la HK 1. Por esto, los estudios de regulación mostrados en los siguientes apartados, están hechas tomando en consideración solo la participación de la HK 1 en la fosforilación de fructosa, a menos que se indique otra cosa.

En el caso de los resultados obtenidos para la manosa, se observa que, igualmente a lo descrito con los azúcares ya citados, la cinética se puede ajustar a un único sistema de fosforilación. De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente por nosotros, esto no sería lo esperado, puesto que la afinidad por la manosa resultó muy diferente al determinar la Km en la HK 1 y la GK. La hexoquinasa fue casi un orden de magnitud menos afín por la manosa que la GK. En cualquier caso, la afinidad para la fosforilación de manosa de *Candida utilis* resultó muy semejante a la que mostró la GK en su estudio específico. Estos resultados sugieren que la hexoquinasa mayoritaria podría resultar más afín por la manosa en condiciones de funcionamiento fisiológico que en las condiciones previamente determinadas para la obtención de la máxima actividad en saturación por el sustrato.

Las Km determinadas en el sistema celular para cualquiera de los azúcares



**Fig. 1.** Cinética de fosforilación total de los distintos sustratos utilizados por las hexoquinasas de *Candida utilis*. **A** Fosforilación de glucosa. **B** Fosforilación de fructosa. **C** Fosforilación de manosa. **D** Fosforilación de glucosa con distintas concentraciones de ATP. Símbolos: En la fig. A, B y C (□) velocidad de fosforilación del sustrato. Fig. 1D (□) Fosforilación con ATP 1 mM. (■) Fosforilación de glucosa con ATP 0.5 mM. (○) Fosforilación de glucosa con ATP 0.2 mM.

utilizados fueron levemente distintos a los que se dedujeron para cada una de las enzimas individuales en condiciones de funcionamiento óptimo. De nuevo las constantes deducidas, se asemejan más a las que han sido previamente publicadas en levaduras distintas a *Saccharomyces cerevisiae* que para las de *Saccharomyces* (Espinell, 1991).

Cuando se analizó la actividad de fosforilación de *Candida utilis* en función del ATP en medios saturados de magnesio y con glucosa como azúcar fosforilable, se obtuvieron cinéticas cuasi-lineales solo con la mayor concentración de ATP utilizado. Cuando la concentración del cofactor disminuía, se apreciaron cinéticas ajustables a sistemas bifásicos (Fig. 1D). Esto sugiere que la afinidad por ATP es distinta al menos en cada una de las enzimas mayoritarias que contiene la levadura. Esto estaba de acuerdo a las conclusiones que alcanzamos previamente (Espinell, 1991), donde al determinar que la GK poseía menor afinidad por ATP, formulamos la hipótesis de que esta enzima sería la responsable de ajustar la velocidad de fosforilación de glucosa cuando las concentraciones del nucleótido fueran relativamente bajas en nuestra levadura.

Respecto a las  $V_{max}$  deducidas de los análisis utilizados, se concluye que *Candida utilis* tiene una capacidad de fosforilación de azúcares superior a la capacidad de consumo de estos mismos azúcares. Asumiendo que el contenido de proteína en *Candida utilis* es del 50% (Lichfield, 1979; Verduyn, 1991) y tomando el valor de actividad conseguido en células permeabilizadas, podemos calcular una capacidad máxima de fosforilación de alrededor de 10.5 mmol/(g peso seco·h), el doble de la capacidad de consumo de hexosas en estas condiciones. Esto no siempre ocurre en otras levaduras. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha comunicado que la actividad hexoquinasa, medida en las condiciones óptimas, es muy semejante a la capacidad de consumo y transporte de hexosas (Gancedo y Serrano, 1989). Estos resultados sugieren que las hexoquinasas en *Candida utilis* tengan un muy escaso control en la velocidad de glucolisis.

### 3.1.2. Estudio de la respuesta de la actividad hexoquinasa a distintos efectores con significación fisiológica.

De la bibliografía se han recogido efectores de la actividad hexoquinasa que funcionan como inhibidores o inactivadores que pueden ser tomados en consideración en ambientes naturales.

**3.1.2.1. Inhibición por xilosa.** Se ha descrito que las distintas enzimas fosforilantes de hexosas de *Saccharomyces cerevisiae* pueden ser inhibidas por xilosa *in vitro* (De la Fuente y col., 1970; Fernández y col., 1985). Este fenómeno puede ser también reproducido en otras levaduras a altas concentraciones de xilosa, como en *Rhodotorula glutinis* (Mazón y col., 1975), donde se determina una  $K_i$  de 300-400 mM. En el caso de la hexoquinasa PI y glucoquinasa de *Saccharomyces* ( $K_i$  25 y 0.85 mM, respectivamente), la xilosa se ha mostrado como un inhibidor competitivo de la fosforilación de glucosa, mientras que lo es no competitivo en el caso de la hexoquinasa PII ( $K_i$  80 mM).

En extractos crudos de *Candida utilis* en condiciones fisiológicas, se procedió a determinar la capacidad inhibitoria (Tabla II), no hallándose valores de inhibición significativos en los rangos de concentración de xilosa ensayados, mientras que somos capaces de reproducir el efecto inhibitorio predicho en la enzima purificada de



*Saccharomyces*, por lo que descartamos que la xilosa sea capaz de provocar inhibición de la actividad fosforilante a concentraciones fisiológicas.

**Tabla II.** Efecto inhibitorio por xilosa de la actividad hexoquinasa total en *Candida utilis*<sup>1</sup>.

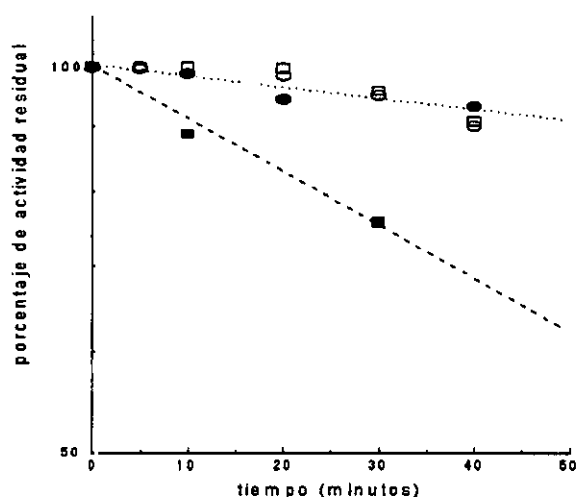
	concentración del efector			
	xilosa 25 mM		xilosa 100 mM	
	fosforilación de glucosa		fosforilación de glucosa	
	1 mM	100 mM	1 mM	100 mM
<i>Candida utilis</i>	100±0.1	94.3±1.2	100±0.2	94.2±0.5
HK PII	94.3±1.7	53.7±0.9	61.1±2.3	62.5±3.1

<sup>1</sup> Valores expresados en porcentaje de actividad remanente comparado con los controles en ausencia de xilosa

**3.1.2.2. Inactivación por xilosa.** Esta pentosa es capaz de desencadenar otros fenómenos distintos a la inhibición en hexoquinasas de levadura. Se ha comunicado la capacidad de inactivar todas las enzimas fosforilantes de hexosas en *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández y col, 1985). Este efecto no parece ser específico de levaduras, puesto que previamente se comunicó que la xilosa es capaz de inactivar también hexoquinasas de animales (Lazo y Sols, 1979). En *Saccharomyces* parece que los mecanismos de inactivación pueden ser distintos en cada una de las enzimas, ya que mientras en la HK PI, la inactivación es dependiente de ATP, no lo es tanto en la HK PII, y, en el caso de la glucoquinasa, parece que la inactivación puede ser evitada por la presencia de ATP. El fenómeno de inactivación ha sido descrito a nivel molecular en la HK PII de *Saccharomyces* por Fernández y col. (1986) indicándose que la xilosa induce un proceso de autofosforilación de la enzima.

Estudiamos la capacidad inactivadora de la xilosa en extractos crudos de *Candida utilis* ensayando las máximas concentraciones utilizadas en los estudios con enzimas de *Saccharomyces* (Fig. 2). Los resultados muestran que la xilosa es incapaz de inactivar las enzimas fosforilantes de hexosas (utilizando fructosa o glucosa como sustratos). Estos resultados fueron discrepantes comparándolos con los obtenidos con fracciones enriquecidas de HK I y GK en ensayos a pH 8 y 30°C de temperatura (Espinell, 1991), donde observamos que estas enzimas podían ser inactivadas siguiendo los patrones descritos para la HK PII y GK de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. La razón de esta discrepancia puede hallarse en las distintas condiciones experimentales utilizadas o, muy posiblemente, en que, durante el proceso de enriquecimiento, estas enzimas puedan ser afectadas en su estabilidad, como pudo deducirse con la fracción enriquecida de la glucoquinasa de *Candida utilis*, que padecía una inhibición *in vitro* por glucosa en determinadas condiciones experimentales no reproducida en condiciones fisiológicas, ni en ensayos *in vivo*. De cualquier manera, se ha descrito que la presencia de xilosa en medios

de cultivos mixtos con glucosa, no induce ninguna alteración en las características de crecimiento de *Candida utilis*. El crecimiento es diáuxico, y el último tramo de crecimiento se efectúa sobre xilosa (Hsiao y col, 1982), lo que revela la prevalencia de la represión catabólica y el funcionamiento correcto de la actividad hexoquinasa durante la primera fase de crecimiento sobre glucosa. Si la xilosa afectara a las hexoquinasas, de ser transportada dentro de la célula, se esperarían defectos durante el crecimiento sobre glucosa y alteraciones en el control de represión catabólica, como se ha descrito en *Saccharomyces* (Fernández y col., 1984). En dicha levadura la presencia de xilosa en el medio de crecimiento elimina la actividad hexoquinasa y provoca la desrepresión de la levadura en presencia de glucosa.



**Fig. 2.** Efecto de la xilosa como inactivación de la actividad hexoquinasa (Fosforilación de glucosa total). Símbolos: (○) Extractos crudos de *Candida utilis* tratadas con xilosa 100 mM. (●) Extractos de *Candida utilis* con xilosa 100 mM y ATP-Mg<sup>2+</sup> 4 mM. (□) Actividad control de *Candida utilis*. (■) Control con HK PII de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otro lado, descartamos que la ausencia de inactivación por xilosa en las hexoquinasas de nuestra levadura sea debida al consumo de xilosa por parte del extracto enzimático, puesto que los ensayos de actividad xilosa reductasa, como enzima inicial del metabolismo de xilosa en *Candida utilis*, son casi nulos, de forma que solo serían capaces de hacer desaparecer una mínima parte de la xilosa presente en la mezcla de reacción, aún en el caso de que existiera NADPH necesario para que esta reacción tuviera lugar.

**3.1.2.3. Inhibición por trehalosa-6-fosfato.** Recientemente se ha comunicado la capacidad inhibitoria de hexoquinasas de levadura por parte de la trehalosa-6-P. Este intermediario metabólico en la síntesis de trehalosa es capaz de inhibir la capacidad fosforilante de fructosa y glucosa de la HK PII y HK PI, mostrándose más sensible la hexoquinasa mayoritaria. Sin embargo la GK de *Saccharomyces* es insensible a trehalosa-6-P incluso a concentraciones de 5 mM. Este efector aparece como inhibidor casi universal

de la actividad hexoquinasa en levaduras, puesto que, se han descrito al menos 4 especies de levadura afectadas por este metabolito y también inhibe la hexoquinasa de cerebro de ratón (Blázquez y col., 1993). Sólo la actividad hexoquinasa de *Schizosaccharomyces pombe* parece insensible al efecto inhibitorio de la trehalosa-6-P (Blázquez y col., 1993). La relación de la trehalosa-6-P y las hexoquinasas parece tener una función *in vivo* ya que se puede explicar por qué el flujo glucolítico no se desregula tras la adición de glucosa, por el hundimiento de los niveles de ATP (González y col., 1992). Incluso en *Schizosaccharomyces pombe*, donde este intermediario parece no regular la actividad hexoquinasa, el gen TPS1, implicado en la síntesis de trehalosa-6-P, parece que está relacionado con el proceso de germinación de esporas en esta levadura (Blázquez y col., 1994). El mecanismo por el cual el metabolismo de la trehalosa regula en *Saccharomyces cerevisiae* el flujo inicial del metabolismo está actualmente en discusión (Thevelein y Hohmann, 1995).

Cuando nosotros ensayamos el efecto *in vitro* de la trehalosa-6-P en extractos crudos encontramos que el metabolito es capaz de inhibir la actividad hexoquinasa de nuestra levadura, siempre que los ensayos sean realizados en condiciones fisiológicas (Tabla III). Sin embargo, cuando las condiciones de trabajo se ajustaron a las óptimas para la actividad hexoquinasa, no encontramos inhibición apreciable en las concentraciones del inhibidor ensayadas.

**Tabla III.** Efecto inhibitorio por trehalosa-6-P 1 mM de la actividad hexoquinasa total en *Candida utilis*<sup>1</sup>.

<i>Candida utilis</i>				HK PII <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
fosforilación de glucosa		fosforilación de fructosa		fosforilación de glucosa	
1 mM	25 mM	10 mM	25 mM	1 mM	25 mM
Ensayo a 30°C y pH 8					
0	6.3±0.1	0	5.4±0.2	0	0
Ensayo a 28°C y pH 7					
67.5±1.2	54.6±0.3	95.3±0.9	84.3±1.1	63.5±1.5	85.4±2.1

<sup>1</sup> Resultados expresados en % de inhibición.

Estos resultados sugieren que el efecto regulador de la actividad hexoquinasa por trehalosa-6-P son específicos para entornos fisiológicos de ensayo. La inhibición de la actividad hexoquinasa debe consistir en una inhibición competitiva, puesto que al aumentar las concentraciones de los sustratos enzimáticos, el nivel de inhibición descende. La ausencia de inhibición en las condiciones de determinación de actividad óptima para *Candida utilis* fue también determinada con enzima comercial de *Saccharomyces*

*cerevisiae*.

**Tabla IV.** Efecto de la presencia de glucosa-6-fosfato en la capacidad de fosforilación de glucosa 100 mM en *Candida utilis*<sup>1</sup>.

concentración de glucosa-6-fosfato en la reacción				
control	0.1 mM	1 mM	10 mM	25 mM
100	101±0.2	99.2±0.7	99.5±0.7	98±3.2

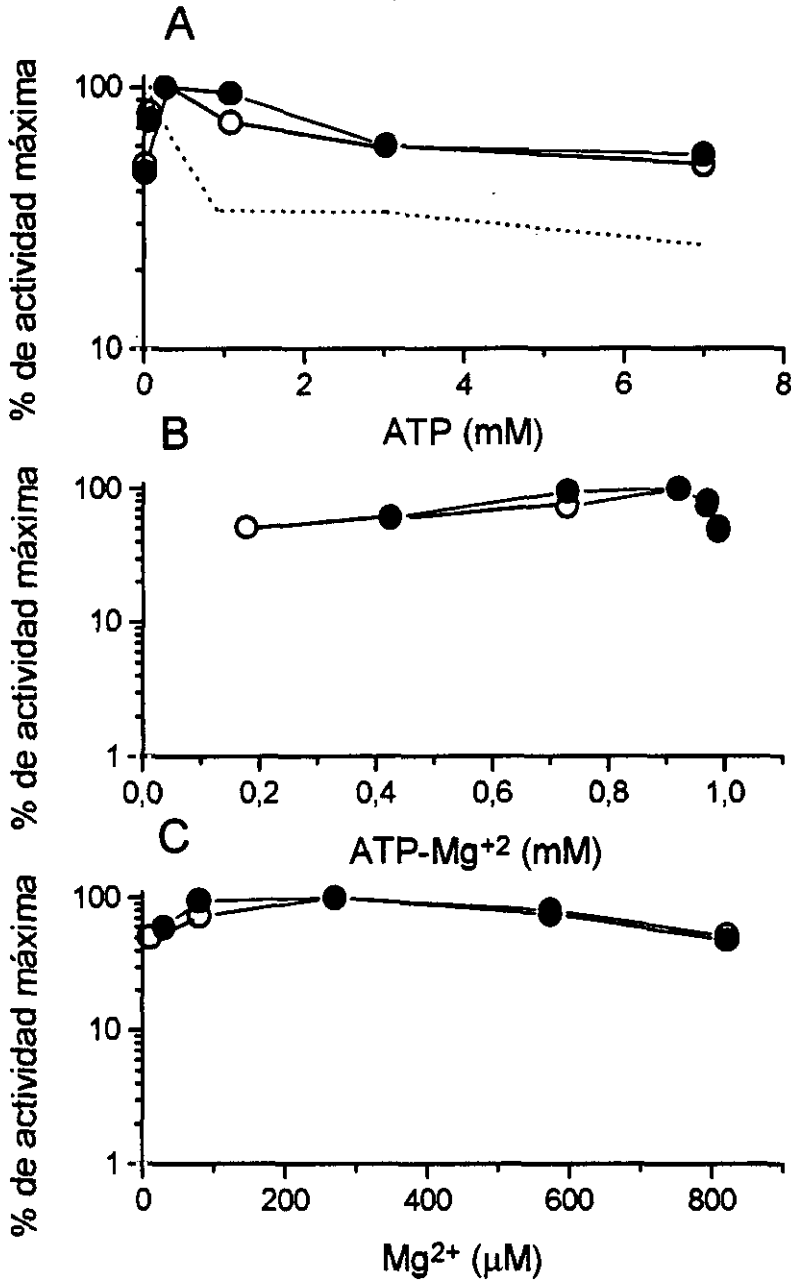
<sup>1</sup> Valores expresados en porcentaje de actividad residual. La velocidad de las reacciones se midieron mediante la determinación del ADP producido tras la fosforilación del azúcar.

Al otorgar a la trehalosa-6-fosfato el papel regulador en el flujo glucolítico que ejerce la glucosa-6-fosfato en hexoquinasas de animales, y encontrar que también las hexoquinasas de *Candida utilis* son sensibles a trehalosa-6-fosfato, fue preciso demostrar que en nuestra levadura la acumulación el producto fosforilado de la reacción hexoquinasa no afecta la velocidad de la enzima (Tabla IV). De esta manera, se garantizó que el hipotético efecto en la regulación de la glucólisis, solo se encontraría en al acumular trehalosa-6-P.

**3.1.2.4. Inhibición por ATP libre de magnesio.** Se ha indicado que las hexoquinasas de *Saccharomyces cerevisiae* son incapaces de utilizar como co-sustrato de la fosforilación de hexosas el ATP a altas concentraciones (Kopetzki y Entian, 1985). Esto es debido a que el exceso de ATP implica la aparición de ATP libre de magnesio en el caso de que las concentraciones de magnesio no se dosifiquen en paralelo a las del nucleótido en la mezcla de ensayo. De esta manera, el único sustrato del que las hexoquinasas son capaces de obtener el fosfato necesario para la reacción es el complejo ATP-Mg<sup>2+</sup>. La presencia de ATP libre de magnesio se traduce cinéticamente en un descenso de la Vmax y aumento de la Km para el nucleótido en las dos isoenzimas HK PI y HK PII de *Saccharomyces* (Moreno y col., 1986). Estos autores sugieren que este mecanismo de inhibición tiene relevancia fisiológica, puesto que registraron mayores niveles de magnesio en estados de represión que en desrepresión, mientras que los niveles de ATP eran constantes, regulando el nivel de actividad hexoquinasa *in vivo*.

En extractos crudos obtenidos de la cepa salvaje de *Candida utilis* realizamos un abordaje experimental semejante al propuesto por Moreno y col. (1986) para las enzimas de *Saccharomyces*. La relación de ATP libre de magnesio, de Mg<sup>2+</sup> libre y de nucleótido acompañado con el ión fueron deducidas de acuerdo a la Ka del complejo con valor 1·10<sup>4</sup> M, utilizado por los autores citados en su trabajo. Los resultados esperados en las hexoquinasas de *Saccharomyces* fueron confirmados mediante la utilización de la enzima comercial (Fig. 3).

En la HK PII de *Saccharomyces*, enzima mayoritaria en los estados de represión, la actividad fosforilante se reduce, según los datos de la bibliografía, a un 30% con respecto al control a concentraciones superiores a 0.2 mM. Pero la capacidad fosforilante



**Fig. 3.** Efecto de la presencia de ATP libre de magnesio en la actividad hexoquinasa total de *Candida utilis*. **A** Actividad residual en función de la concentración de ATP libre de magnesio. **B** Actividad en función de la concentración de ATP-Mg<sup>2</sup>. **C** Actividad dependiente de la concentración de Mg<sup>2+</sup>. Símbolos. (○) Fosforilación de glucosa. (●) Fosforilación de fructosa. Línea punteada: actividad residual de la enzima comercial HK PII de *Saccharomyces cerevisiae*.

importante que es independiente de la concentración de ATP en el ensayo, por lo que se puede especular con el significado fisiológico de la inhibición por ADP, en condiciones donde la concentración del nucleótido sean en torno a mM (Tabla VI).

**Tabla VI.** Efecto inhibitorio de la actividad hexoquinasa total de *Candida utilis* por ADP y AMP<sup>1</sup>.

concentración de ATP en el ensayo: 2 mM			
inhibidor: ADP 2 mM		inhibidor: AMP 2 mM	
fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM	fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM
38.3±0.7	37.5±0.5	12.1±1.1	12.3±0.9
concentración de ATP en el ensayo: 0.2 mM			
inhibidor: ADP 2 mM		inhibidor: AMP 2 mM	
fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM	fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM
41.3±0.7	42.0±0.6	13.6±1.1	13.0±0.8

<sup>1</sup> Resultados en porcentaje de inhibición de la actividad en relación al control.

### 3.2. Respuesta de la actividad hexoquinasa según el medio de crecimiento y fase de cultivo y determinación del nivel de represión.

3.2.1. **Análisis en cultivos en discontinuo.** La actividad hexoquinasa en levaduras puede variar de acuerdo a la fuente de carbono utilizada en el medio y la fase de crecimiento del cultivo. Así, la capacidad total de fosforilación de glucosa es la predominante en condiciones gluconeogénicas en *Saccharomyces cerevisiae*, debido a la abundancia de la glucoquinasa en estas condiciones. Mientras que en condiciones de represión o crecimiento sobre sustratos glucolíticos, la capacidad fosforilante mayoritaria corresponde a la HK PII (Gancedo y col., 1977; Fernández y col., 1984, Fernández y col., 1985). El nivel total de actividad hexoquinasa no tiene por qué ser estable durante todas las fases de crecimiento en esta levadura, pues se han descrito casos que presentan fuertes incrementos de actividad de fosforilación de fructosa tras el crecimiento en glucosa y antes de iniciarse el consumo de etanol producido en la primera fase de crecimiento (Richard y col., 1994). Por otro lado, el nivel de actividad de fosforilación total en *Saccharomyces* permanece sin grandes variaciones a lo largo del ciclo celular de la levadura en cultivos en discontinuo (de Koning y col., 1991).

Sin embargo, cuando se estudian otras levaduras, se observan variaciones respecto a la regulación de la actividad hexoquinasa en función de la fase de crecimiento y fuente de carbono. Ya se ha descrito que dentro del género *Candida*, por su heterogeneidad, coexisten especies con actividad constitutiva independiente de la fuente de carbono (*Candida lipolytica*) y especies donde la hexoquinasa es inducible por glucosa y la glucoquinasa inducible por fuentes de carbono gluconeogénicas (*Candida tropicalis*) (Hirai y col., 1977).

Otro abordaje utilizado ha sido el estudio del control de la transcripción de los mensajeros de cada una de las enzimas implicadas en la fosforilación de hexosas. Se ha comunicado que, aunque la actividad GK parece depender de la presencia de glucosa, sin embargo, la expresión de la GK aparece como constitutiva (Albig y Entian, 1988). Y, al contrario, en un análisis reciente del nivel de transcripción de células crecidas en discontinuo con distintas fuentes de carbono, se ha comunicado que no existen niveles detectables de ARNm correspondiente a la GK, cuando *Saccharomyces cerevisiae* crece sobre sustratos fermentables y tiene una alta expresión con sustratos no fermentables, mientras que la HK PII se expresa fuertemente en condiciones de represión y la HK PI, descrita como una enzima constitutiva por la actividad de la proteína, está sujeta a regulación en el nivel de la transcripción, pues se detecta gran cantidad de ARNm con fuentes gluconeogénicas y galactosa (Herrero y col., 1994).

Nuestros resultados obtenidos con el análisis de la evolución de las enzimas fosforilantes de hexosas en *Candida utilis* en las distintas fases del crecimiento sobre glucosa, concluyeron que la actividad fosforilante total de glucosa permanecía casi estable, aunque existían pequeñas variaciones en los niveles de actividad de la HK1 y GK: La hexoquinasa era inducida parcialmente en la fase exponencial de crecimiento, mientras que la enzima predominante durante la fase estacionaria era la GK y la enzima minoritaria HK2 parecía constitutiva (Espinell, 1991).

Aquí afrontamos el estudio de la evolución de estas actividades en función de la fuente de carbono en células permeabilizadas y su relación con el estado fisiológico de represión. El nivel de represión se determinó tras el análisis de dos de las enzimas descritas

como reprimibles por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*: la  $\alpha$ -glucosidasa y la invertasa externa (como revisión ver Gancedo, 1992, Trumbly, 1992 y Entian y Barnett, 1992).

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla VII**.

**Tabla VII.** Actividad hexoquinasa total y enzimas testigo de represión catabólica en *Candida utilis* procedente de distintos medios de cultivo y fases de crecimiento.

medio	fase exponencial <sup>1</sup>			fase estacionaria <sup>1</sup>		
	fosforilación de		F/G	fosforilación de		F/G
glucosa	350±5.3	396±6.1	1.12	233±7.8	246±9.9	1.05
fructosa	378±3.7	405±7.8	1.07	230±10.1	237±13.2	1.03
maltosa	498±25.7	656±27.3	1.31	346±10.2	346±8.6	1.00
sacarosa	383±6.8	390±8.9	1.02	511±37.3	559±29.7	1.09
acetato	279±5.9	310±11.0	1.11	231±8.4	196±2.7	0.85
etanol	232±3.2	256±4.7	1.10	201±1.7	211±3.5	1.04

medio	$\alpha$ -glucosidasa <sup>2</sup>		invertasa externa <sup>3</sup>	
	fase exponencial	fase estacionaria	fase exponencial	fase estacionaria
glucosa	0.14±0.1	9.60±1.7	8.33±5.7	11.7±1.7
fructosa	0.23±0.2	7.53±2.3	10.2±3.9	13.5±2.0
maltosa	89.9±10.3	57.8±9.8	24.3±3.7	22.3±2.8
sacarosa	4.50±1.3	6.17±1.1	38.3±5.7	25.7±3.5
acetato	3.60±0.9	3.41±0.9	57.8±10.1	17.2±3.5
etanol	2.25±1.0	5.87±1.3	33.5±5.4	40.3±7.8

<sup>1</sup> Actividad en nmol/(mg proteína·min). <sup>2</sup> Actividad en nmol PNP/(mg proteína·min). <sup>3</sup> Actividad en  $\mu$ mol glucosa liberada/(mg proteína·h).

Pudimos determinar que, a excepción de los valores obtenidos en crecimientos con etanol, la capacidad de fosforilación total de glucosa no presenta grandes variaciones en ninguno de los sustratos de crecimiento. A su vez, el análisis de la participación en la fosforilación total por cada una de las dos enzimas mayoritarias en *Candida utilis* revela que, al igual que en el estudio de la regulación de estas enzimas durante el crecimiento en glucosa, no se puede predecir cambios importantes en el nivel de las enzimas individuales.



Con estos resultados, se puede asignar a *Candida utilis* un comportamiento más parecido al descrito en *Candida lipolytica* que a otras levaduras, respecto a la actividad de las actividades hexoquinasas.

Como se ha sido descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (ver revisiones antes citadas), la  $\alpha$ -glucosidasa tiene una regulación compleja. Es reprimible por glucosa, se pueden encontrar niveles de actividad basales en ausencia del represor utilizando sacarosa, etanol o acetato, con diferencias de uno o dos órdenes de magnitud respecto a los niveles de represión, y se induce fuertemente cuando en el medio está presente la maltosa. En cuanto a la invertasa, también el modelo de *Saccharomyces* se reproduce en nuestra levadura. Es una actividad que es reprimible por glucosa, aunque parece no requerir la presencia del sustrato como inductor de la enzima. El descenso de actividad encontrado en muestras extraídas en la fase estacionaria pudiera explicarse por la presencia de proteasas que actúen sobre la enzima o por la existencia de entornos de pH ácidos en el medio que pudieran afectar la estabilidad de esta proteína, o por el descenso generalizado en la síntesis de proteínas registrado en levaduras al entrar en esta fase (Fuge y col., 1994). Aunque en *Saccharomyces cerevisiae* el control genético de la expresión de estas enzimas está dilucidado, no poseemos ningún dato en *Candida utilis* que nos permita conocer si los circuitos íntimos de represión e inducción para la actividad maltasa y represión de la invertasa son semejantes a los de *Saccharomyces*. Pero desde el punto de vista fisiológico, la respuesta de estas actividades respecto a la represión e inducción son semejantes a las de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con el estudio del nivel de actividad de estas enzimas testigos de represión, podemos relacionar la presencia de hexoquinasa con el grado de represión o desrepresión en los que se encuentra las células. En *Saccharomyces cerevisiae*, el uso del parámetro F/G que estima el grado de actividad de las hexoquinasas en relación a la actividad total de fosforilación de hexosas podría servir para establecer el grado de represión en el que se encuentran las células. Cuando los cultivos han sido realizados sobre fuentes que desencadenan represión, este valor excede de 1 y se puede deducir que la fosforilación predominante es debida a la HK PII. Existe, por tanto una relación directa entre altos valores de F/G -entre 1.2 y 1.6, según autores- y represión de aquellas enzimas pertenecientes a aquellos circuitos controlados por la HK PII (Fernández y col., 1984 y 1985; Entian y Fröhlich, 1984; Ma y col., 1989; Rose y col., 1991). En nuestro caso, independientemente de la actividad total de fosforilación obtenidas con las distintas fuentes de carbono donde han sido crecidas la levadura, la relación F/G permanece invariablemente en torno a 1 en la fase exponencial de crecimiento y decrece en la fase estacionaria. Se puede concluir que el cálculo de la relación F/G no resulta útil para determinar el nivel de represión en nuestra levadura, al contrario que sucede en *Saccharomyces cerevisiae*.

**3.2.2. Análisis en cultivos continuos.** Se conocen conclusiones obtenidos mediante el uso de la técnica de cultivo continuo en *Saccharomyces cerevisiae* sobre distintas fuentes de carbono. Cuando la tasa de crecimiento se controla en el rango del consumo oxidativo de glucosa, se puede observar como la actividad hexoquinasa total permanece constante a lo largo de todas las D utilizadas (Sierkstra y col., 1992), no experimenta grandes variaciones cuando la levadura crece sobre glucosa en limitación de nitrógeno (Sierkstra y col., 1994) o sobre un sustrato glucolítico capaz de sustentar un alto flujo metabólico,

como galactosa (Sierkstra y col., 1993). Tampoco parece que los niveles de fosforilación totales en *Saccharomyces* varíen a lo largo de las D de ensayo en cultivos realizados en anaerobiosis fermentando maltosa (Weusthuis y col., 1993).

Al igual que ya se ha expuesto para los análisis en discontinuo de la actividad hexoquinasa total, la regulación génica de las enzimas encargadas de la fosforilación no tiene porque reflejarse en el nivel enzimático de actividad. El grupo de Theo Verrips ha estudiado extensamente el nivel de ARNm en distintos cultivos en continuo sobre varios sustratos. Determinaron que el nivel de mensajero de la HK PII aumenta, de forma global, cuando lo hace la tasa glucolítica en medios con glucosa, mientras que, como ya se ha expuesto en medidas en cultivos en discontinuo, la cantidad de mensajero de HK PI es inversamente proporcional a la tasa de adición de glucosa en el quimiostato (Sierkstra y col., 1992, 1993 y 1994).

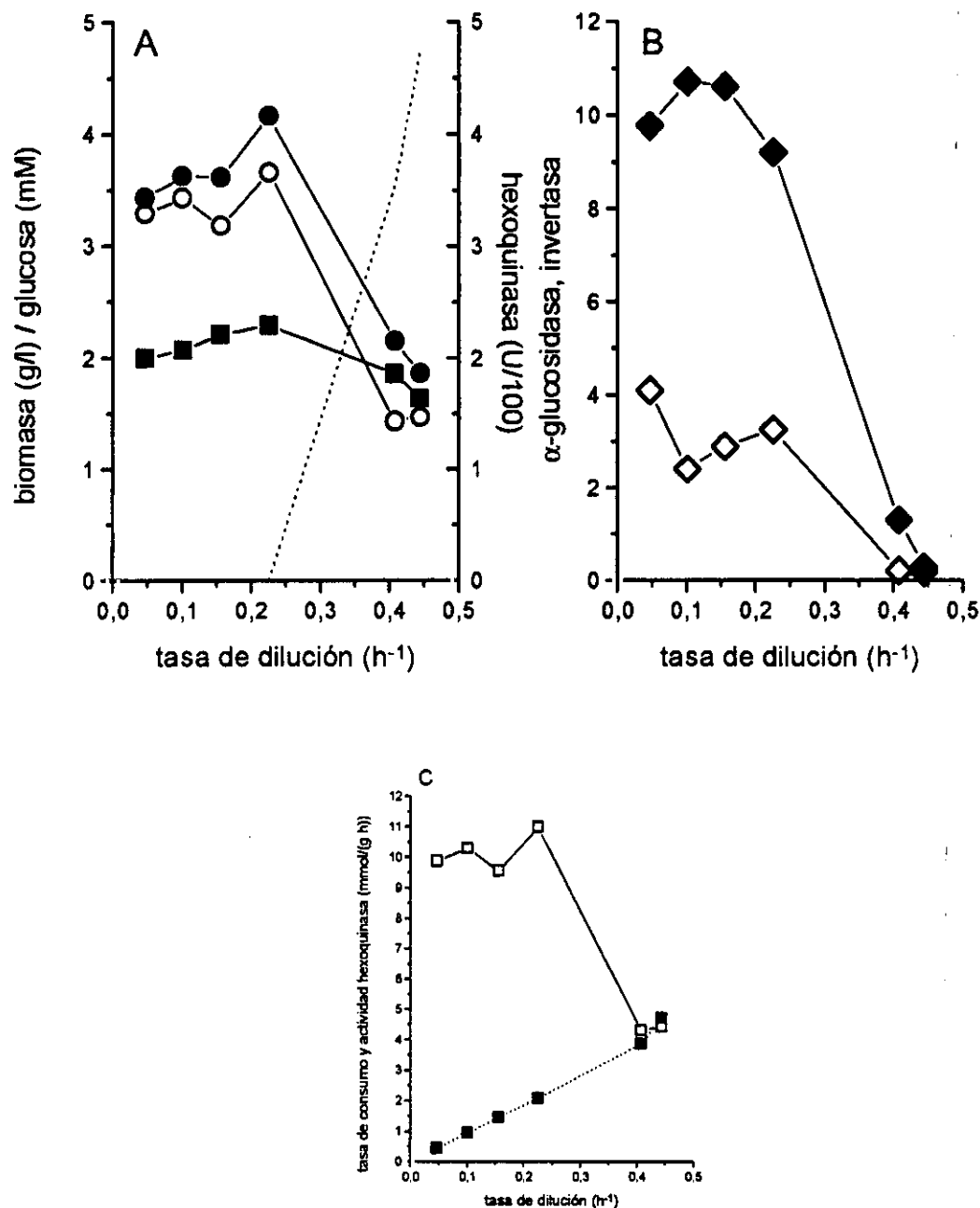
Sin embargo el estudio de la evolución de esta actividad en otras levaduras es limitado y para *Candida utilis*, solo se ha comunicado los resultados obtenidos respecto a la capacidad de fosforilación total de glucosa (Postma y col., 1988), por lo que las conclusiones son insuficientes.

Nosotros hemos realizado distintos crecimientos en continuo y hemos determinado la capacidad total de fosforilación de glucosa y fructosa, con el fin de averiguar el grado de intervención de la hexoquinasa mayoritaria respecto al total de fosforilación en condiciones fisiológica controladas. (Fig. 4A, 4B).

Respecto al crecimiento en limitación de glucosa, la línea general de evolución de la capacidad total de fosforilación de glucosa, coincide con lo anteriormente publicado por otros autores (Postma y col., 1988). Encontramos que, tras analizar la evolución de la actividad fosforilante de fructosa, ésta también corre en paralelo con la de glucosa, sugiriendo que la proporción de la fosforilación de hexosas total correspondiente a la hexoquinasa mayoritaria permanece sin grandes variaciones a lo largo de todas las tasas de crecimiento. Además la actividad total ensayada en células extraídas a tasas de dilución donde la concentración de glucosa libre en el fermentador está incluso por debajo del límite de detección, es muy superior a la encontrada cuando las tasas de dilución se acercan a las de lavado y la concentración de glucosa libre está en el rango de mM.

Esta situación es distinta a la que ya hemos comentado cuando se analizaron las actividades totales en discontinuo. La razón de estos cambios se encontró en las condiciones específicas en las que se realizaron ambos tipos de cultivos. Mientras que en discontinuo, además de carecer de sistemas suficientes para el control de determinados parámetros ambientales, como pH o concentración de sustancias producidas durante el metabolismo, la fase de crecimiento exponencial se realiza, en gran medida, cuando la concentración de la fuente de carbono satura la capacidad del microorganismo para consumirla. Se alcanza la fase estacionaria del crecimiento cuando el sustrato limitante se agota. En cultivos continuos, la capacidad de crecimiento se limita por la disponibilidad de la fuente limitante y, aunque los niveles del sustrato limitante sean casi despreciables en la cubeta de fermentación, se realiza una adición continua de sustrato. Además, se procede a un control efectivo de otros parámetros ambientales que pueden afectar en los resultados finales conseguidos en crecimiento en discontinuo.

De cualquier manera, estimando la capacidad total de fosforilación en nuestras levaduras a altas tasas de dilución, tras asumir que el contenido en proteína de nuestra levadura es el 50% de la biomasa seca, según Lichfield (1979) y Verduyn (1991), puede



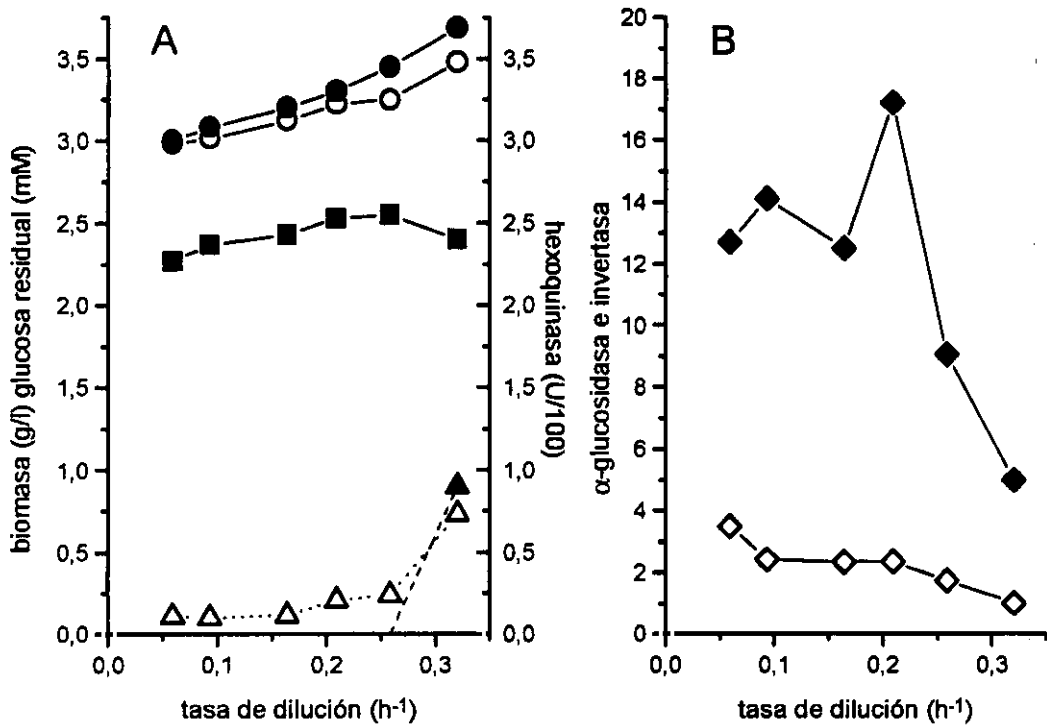
**Fig. 4.** Cultivo continuo de *Candida utilis* con glucosa. Relación de la actividad hexoquinasa con la represión catabólica. **A** Actividad hexoquinasa total en relación con la biomasa y la glucosa residual en el fermentador. **B** Actividades de enzimas testigos de represión. **C** Relación entre la capacidad de fosforilación de glucosa y tasa de consumo. Símbolos: Para las fig. A y B: (■) biomasa (g/l). Línea punteada: concentración de glucosa residual (mM). (○) Fosforilación de glucosa. (●) Fosforilación de fructosa. (◆) Actividad

inferirse que en estas situaciones, los valores de fosforilación de hexosas se asemejan a la tasa de consumo de glucosa, por lo que la actividad hexoquinasa puede llegar a ser limitante de la capacidad de crecimiento (Fig. 4C).

En crecimientos realizados en otra fuente de crecimiento glucolítica que permite una fácil asimilación, pero que no desencadena represión en nuestra levadura (determinada por el nivel de actividad de la invertasa y  $\alpha$ -glucosidasa), como la sacarosa, en la tasas de crecimiento donde la concentración de glucosa residual en el fermentador no son suficientemente altas como para considerarlas represoras, el resultado conseguido por nosotros se asemeja cualitativamente al expuesto para crecimientos sobre glucosa (Fig. 5). Por ello, pensamos que el nivel de actividad hexoquinasa total encontrado en cada una de la D ensayadas depende fuertemente de la capacidad metabólica de la levadura, independientemente de la naturaleza del sustrato que sustenta el crecimiento. Esta influencia de la tasa metabólica en el grado de expresión y actividades de distintas enzimas, ha sido ya propuesto por el grupo de Verrips en *Saccharomyces* (Sierkstra y col., 1992; Sierkstra y col., 1993). Sin embargo, la actividad hexoquinasa, considerada como suma de la acción de 3 enzimas, en *Candida* no responde con grandes variaciones a los cambios de flujo metabólico, ni a concentraciones de sustrato en el medio de cultivo, durante las tasas de crecimiento más bajas. La razón de este resultado pudiera deberse a que, en estas condiciones, la levadura posea un exceso de actividad fosforilante para sostener la tasa de flujo metabólico determinada en estado estacionario. Existe un umbral, cuando la concentración de sustrato empieza a ser suficientemente alta, a partir del cual la actividad hexoquinasa tiene una evolución inversa a la velocidad del flujo metabólico.

Cuando analizamos el estado de represión-desrepresión, según el nivel de actividad de las enzimas testigo de represión, encontramos que, como era predecible, a bajas tasas de dilución, tanto la invertasa como la  $\alpha$ -glucosidasa tienen valores de actividad basales. Destacamos que los valores de actividad son, aproximadamente, un orden de magnitud mayores que los que registramos en cultivos en discontinuo. La razón de estos cambios no está suficientemente estudiada, aunque el control de las condiciones ambientales en las que se realiza el crecimiento de la levadura parece ser determinante. Hemos encontrado en la bibliografía otros casos análogos cuando se estudió la actividad de otras enzimas reprimibles por glucosa en otras levaduras (Boze y col., 1989). Como suceso inexplicable para nosotros, al estudiar la evolución de la actividad invertasa, encontramos picos de actividad en cada cambio de D. Miembros de nuestro grupo comunicaron, al estudiar el crecimiento de *Candida utilis* en limitación de zinc, que la actividad de esta enzima no variaba gradualmente con la D (Leyva, 1993) en determinaciones realizadas igualmente en estados estacionarios de cultivos continuos. Cabe la posibilidad de que esta enzima esté sujeta a una regulación sutil, independiente de la represión por glucosa o de la tasa metabólica.

Al aumentar la D, encontramos cantidades determinables de glucosa y cambios en la actividad de ambas enzimas, que pasan a ser lo correspondientes a estados de represión. Confirmamos dos de las observaciones publicadas anteriormente: que el umbral de represión se encuentra en torno a 0.1 g/l glucosa (Peinado y col., 1987a) y que a tasas de D superiores a 0.3 h<sup>-1</sup>, se reprime la posibilidad de utilización de maltosa, por insuficiencia de  $\alpha$ -glucosidasa, según nuestras conclusiones presentadas en esta Tesis, e inactivación y represión del transportador de maltosa en *Candida utilis* (Peinado y col., 1987b). Además,



**Fig. 5.** Cultivo continuo de *Candida utilis* con sacarosa. **A** Actividad hexoquinasa total en función de la biomasa y la concentración residual de azúcares en el fermentador. **B** Actividades de las enzimas testigos de represión catabólica. Símbolos: Como en la Fig. 4. Además en la fig. 5A se representa como triángulos vacíos en la línea punteada representa la concentración residual de sacarosa; y en la línea con triángulos llenos, la concentración residual de la glucosa libre producida por la acción hidrolítica de la invertasa.

---

la utilización de otros sustratos glucolíticos fermentables no implica la aparición de represión catabólica, ya que en experimentos con sacarosa a tasas de dilución donde la concentración de glucosa libre es inferior a la concentración umbral de represión, el nivel de enzimas testigo de represión se corresponde al basal.

Concluimos que, al contrario de lo que predice el modelo desarrollado en *Saccharomyces*, donde se une el estado de represión con altas actividades de fosforilación de hexosas, en nuestra levadura, aunque la evolución de las hexoquinasas parece que sigue el modelo de *Saccharomyces* a bajas tasas de dilución; es decir, sin variaciones importantes de actividad para distintas tasas de crecimiento, sin embargo la actividad hexoquinasa que se encuentra en estados de represión resulta ser inferior a los estados de desrepresión.

### 3.3. Determinación de la relación de la actividad hexoquinasa en el control de la represión catabólica.

En condiciones fisiológicas en *Saccharomyces cerevisiae* siempre se puede describir que durante los estados de represión en la levadura se manifiestan altos niveles de actividad hexoquinasa HK PII (Gancedo y col., 1977, Fernández y col., 1984; Fernández y col., 1985). Ya hemos expuesto que en nuestra levadura esta relación fisiológica no se espera, según los resultados expuestos en estudios en discontinuo y continuo. Con el fin de averiguar si bajos niveles de actividad hexoquinasa pudieran provocar desrepresión en crecimientos sobre sustratos represores, intentamos la obtención de mutantes carentes o con actividad hexoquinasa disminuida y estudiamos el efecto de inactivadores de actividad hexoquinasa *in vivo* sobre la represión catabólica.

**3.3.1. Búsqueda de mutantes afectados en la actividad hexoquinasa.** Ya hemos descrito en Material y Métodos los distintos abordajes utilizados para la obtención de mutantes con actividad hexoquinasa con el propósito de aislar cepas con actividad fosforilante de fructosa insuficiente para el crecimiento sobre fructosa, tras el crecimiento sobre glucosa, con lo que garantizaríamos que, al menos, los presuntos mutantes poseyeran actividad glucoquinasa suficiente para el crecimiento en glucosa.

Con esta metodología descartaríamos la selección de mutantes seriamente afectados en la capacidad de transportar hexosas (puesto que existía un crecimiento previo sobre glucosa) y, mediante la utilización de placas de crecimiento con medio sintético, mutantes auxótrofos o incapaces de crecer sobre medios con una formulación compleja.

De acuerdo al planteamiento experimental, se requería que la glucoquinasa tuviera una acción fisiológica efectiva en crecimientos sobre fuentes fermentables. Recientemente se ha comunicado que, aparentemente, la glucoquinasa carecería de una función real en la fosforilación cuando *Saccharomyces cerevisiae* crece sobre sustratos fermentables (Herrero y col., 1994), coincidiendo en las opiniones actuales que establecen una compartimentalización en las funciones de fosforilación de hexosas según las fuentes de carbono que sustentan el crecimiento (Clifton y col., 1993). Para evitar que una especialización funcional estuviera ocurriendo también en nuestra levadura, utilizamos crecimientos previos sobre etanol.

El tratamiento con nistatina, aunque no resulta estrictamente específico para la selección y enriquecimiento de células incapaces de crecer en unas condiciones determinadas, tiene un fuerte efecto microbicida en aquellas que sí son capaces de crecer (Opekarová y Tanner, 1994). Por lo que esperábamos que solo aquellas células con capacidad hexoquinasa muy restringida resultaran resistentes al tratamiento. Este abordaje ha sido efectivo para el aislamiento de mutantes auxotróficos en otras levaduras (p. ej. Gleeson y col., 1990). Desechamos la utilización de otro tipo de métodos con mutágenos, pues estos pudieran conducir a la obtención de mutantes que no estuvieran alterados en la capacidad concreta de fosforilación, ya que el riesgo de provocar mutaciones que implicaran efectos fisiológicos no deseados, era elevado.

En la **Tabla VIII** describimos el número de colonias resistentes al tratamiento de nistatina y el nivel de actividad hexoquinasa y  $\alpha$ -glucosidasa encontrado en crecimientos sobre glucosa. Ninguno de ellos mostró variaciones en los valores de actividad enzimáticas cuando se les comparó con la cepa salvaje. Tras el análisis de los resultados, desistimos

en el esfuerzo de buscar mutantes por esta vía.

**Tabla VIII..** Búsqueda de mutantes con actividad hexoquinasa disminuida.

procedimiento de aislamiento <sup>1</sup>	nº de aislados	actividad hexoquinasa normal en:	actividad $\alpha$ -glucosidasa normal en:
A	150	todos	todos
B	36	todos	todos
C	183	todos	todos

<sup>1</sup> La descripción de los métodos de selección y aislamiento se especifican en el apartado 2.8.3 de Material y Métodos.

Ninguna de las aproximaciones resultó efectiva. Ni el enriquecimiento de mutantes que pudieran aparecer en la fase exponencial de crecimiento, ni en la estacionaria, ni en crecimientos en medios limitados por nitrógeno, a pesar de que la concentración de nistatina se incrementó notablemente respecto a lo recomendado en la bibliografía (Spencer y Spencer, 1988). Estos dos últimos planteamientos buscaban el aislamiento de mutantes en condiciones donde las posibilidades de mutación fueran, teóricamente, superiores a las que existieran en la fase exponencial del crecimiento. La utilización de cultivos en fase estacionaria o desenergizadas, ha sido recogida en la bibliografía (p. ej. Montenecourt y col., 1973; Michels y Romanowski, 1980; Milbradt y Höfer, 1990).

Los resultados sugerían dos explicaciones: La tasa natural de mutación puede ser muy baja. También es posible que se necesitara graves mutaciones en los genes que codifican para las hexoquinasas para que el producto de la traducción fuera inactivo o con la actividad muy disminuida. También, cobran relevancia los resultados descritos en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan solo una de las enzimas fosforilantes de hexosas. Todas son capaces de crecer en glucosa aquellas que poseen solo una de las hexoquinasas, son también capaces de crecer sobre fructosa, aunque pudieran tener parámetros de crecimiento distintos de las cepas salvajes (Maitra y Lobo, 1977). Nuestros resultados realizados en la caracterización bioquímica de las isoenzimas fosforilantes de hexosas en *Candida utilis* indicaban también que, al menos, la única actividad de la HK 1 o de la GK son suficientes para sustentar el crecimiento sobre glucosa y que la hexoquinasa mayoritaria también contiene actividad fosforilante de fructosa, como para permitir el crecimiento sobre este azúcar (Espinell, 1991).

**3.3.2. Inactivación *in vivo* de la actividad hexoquinasa.** Debido a los resultados negativos que hemos expuesto en el capítulo anterior, emprendimos el estudio del efecto fisiológico en levaduras creciendo en distintas fuentes de carbono con la mayor parte de la actividad fosforilante de hexosas permanentemente inactivada.

Aunque en la bibliografía, se han descrito una serie de metabolitos capaces de afectar de forma permanente a las hexoquinasas de levaduras y hongos, como la



inactivación *in vivo* observada en cultivos de *Saccharomyces* en presencia de xilosa (Fernández y col., 1984),

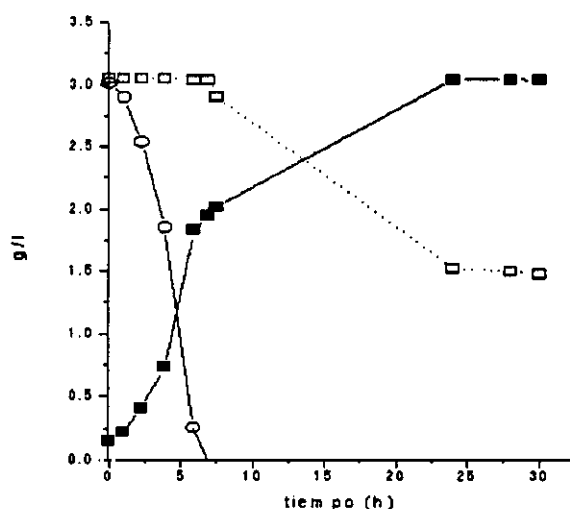


Fig. 6. Cultivo discontinuo de *Candida utilis* con una mezcla de glucosa y citrato. Símbolos: (■) Biomasa ( $DO_{620}$ ). (○) Concentración de glucosa (g/l). (□) Concentración de citrato (g/l).

como ya hemos desarrollado en anteriores capítulos, no es esperable un efecto similar en *Candida utilis*. Otras sustancias con significación fisiológica también tienen un potencial efecto inhibitor de hexoquinasas en levaduras y hongos. Así el ácido benzoico (Sols, 1981), utilizado como conservante en alimentos, se ha descrito como potencial inhibidor de hexoquinasas. Pero se descartó su utilización por la ausencia de un efecto permanente y la carencia de elementos que nos permitieran racionalizar la utilización de este compuesto. El mecanismo de entrada del benzoico parece ser mediante la difusión dentro de la célula de su forma no disociada (Cartwright y col., 1989) y la razón de reparto de forma protonada y disociada depende del pH del medio y este parámetro está sujeto a continuos cambios durante el crecimiento celular. Por otro lado, el benzoico no resulta un agente específico de hexoquinasas, pues se han descrito distintos efectos en el metabolismo de levaduras que parecen depender de especie. El ácido benzoico resulta ser un desacoplador y parece que en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta la capacidad respiratoria, aunque disminuye la efectividad del proceso y aumenta la tasa de mantenimiento de la levadura (Verduyn y col., 1992). En otras levaduras, como *Zygosaccharomyces bailii*, el efecto sobre la respiración es el contrario (Leyva, 1996; Sousa-Dias y col., 1996), al disminuir la capacidad de respirar el sustrato y aumentar la actividad fermentativa.

Otro compuesto que afecta la actividad hexoquinasa en hongos superproductores de citrato es el intermediario del ciclo de Krebs, el ácido cítrico (Steinböck y col., 1994).

Nuestra levadura es capaz de crecer sobre este compuesto como única fuente carbonada (Barnett y col., 1990), pero también muestra represión catabólica en cultivos mixtos con citrato y glucosa, lo que sugiere que las hexoquinasas no están afectadas *in vivo*, puesto que las células son capaces de crecer sobre glucosa (Fig. 6).

A partir de datos bibliográficos, ensayamos el efecto inactivador de distintos compuestos con efecto en hexoquinasas animales y de levadura. Se utilizaron:

- Aloxano (2,4,5,6-tetraoxipiridina) (Lenzen y col., 1990).
- Ninhidrina (hidrato de 1,2,3-indationa) (Lenzen y col., 1990).
- Cibacron Blue 3G-A (Puri y Roskoski, 1994).

Se realizaron crecimientos con distintas concentraciones de estas sustancias (hasta 2 mM) y se determinó las constantes cinéticas de crecimiento. Mientras que las células crecidas en presencia de aloxano no presentaron diferencias ni en la capacidad de crecimiento sobre glucosa ni en la actividad hexoquinasa, las células crecidas en presencia de ninhidrina presentaron tasas de crecimiento muy bajas comparadas con el control, además de formas celulares aberrantes. Los autores que ensayaron este compuesto ya determinaron que la ninhidrina provoca efectos citopáticos no muy bien definidos (Lenzen y col., 1990).

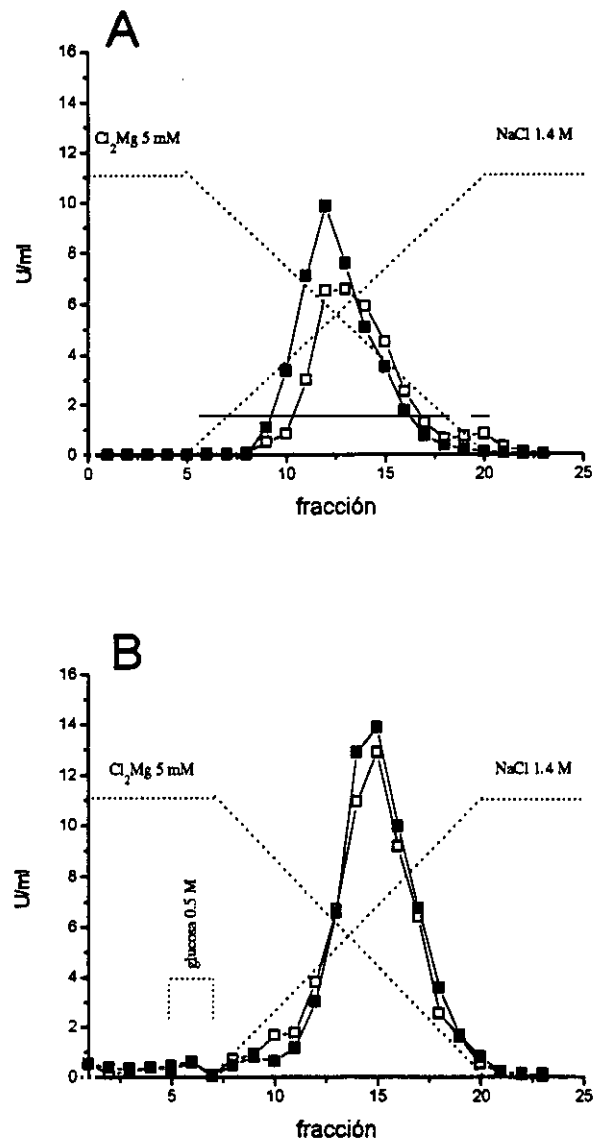
Sólo la utilización del Cibacron Blue 3G-A rindió los resultados esperados y, en torno a él, se han realizado los experimentos descritos a continuación.

El Cibacron Blue 3G-A es una molécula desarrollada como colorante industrial por Ciba-Geigy e ICI (con el nombre comercial de Reactivo 2 o Proción Blue H-B, índice de color 61211). Esta molécula tiene aplicación con fines bioquímicos en la purificación de distintas enzimas (Manual de instrucciones 732-0031, Bio-Rad), como ligandos de pseudo-afinidad, unido a distintas matrices, generalmente de sefarosa. El mecanismo inactivador de hexoquinasas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrito por Puri y Roskoski (1994). Aparentemente, el Cibacron Blue 3G-A puede mimetizar el anillo de purina del ATP y es capaz de ligarse a la proteína por uniones hidrofóbicas rindiendo una inactivación permanente. Concentraciones de colorante de 92  $\mu$ M son suficientes para alcanzar la máxima tasa de inactivación *in vitro*. En este tipo de ensayos, altas concentraciones de glucosa o de ATP son capaces de proteger a la proteína de la inactivación.

**3.3.2.1. Efecto inactivador del Cibacron Blue 3G-A *in vitro*.** Distintos fabricantes han comercializado columnas de cromatografía con el colorante. Con columnas de Bio-Rad, descritas en Material y Métodos, efectuamos una serie de ensayos con el fin de determinar el efecto inactivador del Cibacron Blue 3G-A en extractos crudos, obtenidos de células crecidas en ausencia del colorante.

Según Puri y Roskoski (1994), el colorante inactiva las proteínas de manera permanente. Solo la presencia de glucosa y/o ATP previene la inactivación.

En aquellas columnas que contaban con Cibacron Blue 3G-A como único agente separador de proteínas sólo conseguimos elución de fracciones que contuvieran actividad con el tratamiento de gradientes simultáneos de NaCl y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Fig. 7A). Al contrario que los resultados de Puri y Roskoski (1994), donde la presencia de glucosa en concentraciones en el rango de mM eliminaba el efecto del inactivador, en nuestras hexoquinasas, la



**Fig. 7.** Elución de la actividad hexoquinasa mediante el uso de columnas de cromatografía que contenían Cibacron Blue 3G-A. **A** Columna con el colorante como único agente separador. **B** Cromatograma realizado con una columna Econo-Pac DEAE-Blue. Símbolos: (□) Fosforilación de glucosa. (■) Fosforilación de fructosa. Las líneas punteadas representan la evolución de los gradientes y lavados de columna aplicados. (se recuperó el 70% de la actividad original en la cromatografía de la fig. A y el 95% en el caso de la fig. B

glucosa no era capaz de eliminar la inactivación incluso con 2 órdenes de concentración superior. Tampoco el ATP, incluso en presencia de concentraciones saturantes de magnesio, revertía la inactivación.

Aunque las figuras incluidas solo muestran los resultados respecto a la inactivación con muestras procedentes de cultivos con glucosa, obtuvimos conclusiones similares cuando ensayamos la actividad en las fracciones eluidas de muestras procedentes de otras fuentes de carbono, como acetato y sacarosa, lo que demostraba que los resultados no se debían a características intrínsecas de las hexoquinasas en crecimientos sobre glucosa. La utilización de extractos procedentes de cultivos en estacionario tampoco permitió la elución de actividad en las fracciones recogidas.

Cuando las columnas ensayadas eran capaces de eluir las proteínas mediante dos criterios de separación (DEAE y Cibacron Blue 3G-A) se consiguió la elución en condiciones muy estrictas. El lavado de la columna con los compuestos que evitan la inactivación en hexoquinasas de *Saccharomyces cerevisiae* no evitaba la inactivación de nuestras enzimas. Sin embargo un lavado con NaCl permitió la elución de parte de la actividad enzimática aplicada a la columna. Conseguimos evitar la inactivación casi en su totalidad mediante un lavado previo con glucosa antes del gradiente de NaCl y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Fig. 7B). Con este procedimiento, más del 90% de la actividad aplicada a la columna era recogida en las distintas fracciones. Mediante la determinación del parámetro F/G, se observó que aunque la metodología era apropiada para eliminar la inactivación de nuestras enzimas, no conseguía la separación de ninguna de las isoenzimas. Sin embargo, con otras columnas, que poseían hidroxipatito, si se observaba una separación de las distintas actividades enzimáticas contenidas en *Candida utilis* (Espinell, 1991).

Al igual que sucedía con la utilización de las columnas Econo Pac Blue, los resultados resultaron repetitivos con todas las muestras aplicadas, cualquiera que fuera la fuente de carbono donde se realizaron los crecimientos celulares.

Como conclusión, confirmamos el efecto inactivante del Cibacron Blue 3G-A sobre la actividad hexoquinasa de levadura. Aunque los resultados sugieren que el mecanismo de inactivación pueda ser distinto que el que se ha descrito en la hexoquinasa PII de *Saccharomyces*, pues lavados con altas concentraciones de glucosa o ATP no son capaces de revertir la inactivación.

**3.3.2.2. Inactivación *in vivo* por Cibacron Blue 3G-A.** Con el fin de garantizar el efecto inactivador *in vivo* de Cibacron Blue 3G-A, se efectuaron las adiciones en medio estéril por filtración del compuesto, según las recomendaciones del Servicio Técnico de Sigma Química España.

En cultivos con distinta concentración de colorante y una cantidad inicial de glucosa constante, se comprobó por microscopía óptica que el colorante es capaz de entrar en la célula. Las células tratadas adquirían una coloración azul-verdosa, mientras que los controles eran transparentes a la luz. Repetidos lavados con agua no eliminaban este color.

Efectuamos crecimientos de nuestra levadura sobre medios con distintas fuentes carbonadas, como glucosa (represor), maltosa (inductor de  $\alpha$ -glucosidasa) y etanol (no represor) y distintas concentraciones de Cibacron Blue 3 G-A. Se determinó la actividad hexoquinasa total y nivel de actividad  $\alpha$ -glucosidasa en muestras permeabilizadas extraídas en la fase exponencial del crecimiento (determinada por peso seco, debido a los problemas

que se manifestaron mediante la determinación por densidad óptica), obteniendo estos resultados (Tabla IX).

Los resultados mostraron claramente que la presencia del colorante disminuía la cantidad de hexoquinasa activa, incluso a las concentraciones más pequeñas utilizadas, al menos en crecimientos con glucosa. Tomando en cuenta la concentración para la que se manifiesta la inactivación *in vitro* máxima de la hexoquinasa de *Saccharomyces*, se puede presumir que el inactivador fuera transportado fácilmente al interior de la célula y que se requiere concentraciones en el rango de  $\mu\text{M}$ , al igual que en *Saccharomyces*, para inactivar la mayor parte de la actividad hexoquinasa *in vivo*. Aunque la capacidad fosforilante de glucosa resulta fuertemente afectada por el Cibacron Blue 3G-A, aparentemente, según los datos obtenidos de células crecidas en maltosa y etanol, y al contrario que sugieren los estudios de inactivación *in vitro*, la capacidad para fosforilar fructosa resultaría más resistente a la inactivación, o la presencia de fructosa aliviaría la inactivación.

En ninguna de las actividades fosforilantes con afinidad para glucosa o fructosa se consiguió una inactivación completa de la capacidad de fosforilación, aun a concentraciones de 2 mM. La tasa máxima de inactivación es de alrededor del 90%.

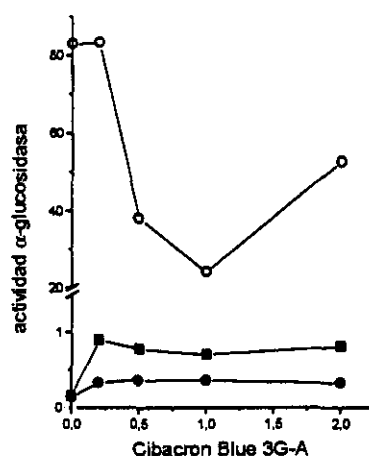
Cada se determinó la actividad  $\alpha$ -glucosidasa obtenida en cada uno de los medios de cultivo, se observó que, en células crecidas en maltosa, la actividad disminuía con la presencia del Cibacron Blue 3G-A. Sin embargo, cada uno de los valores conseguidos fueron cerca de dos órdenes de magnitud superiores en relación con la actividad de los cultivos en glucosa. Deducimos, por tanto, que la presencia del colorante no afecta drásticamente ni los procesos de inducción ni la actividad de la enzima.

En medios con glucosa, la actividad  $\alpha$ -glucosidasa aumentaba levemente cuando se incrementaba la concentración del inactivador. Al comparar los valores de actividad de esta enzima a las mayores concentraciones de colorante con los obtenidos de cultivos con etanol, encontramos que ambos eran semejantes. Asumiendo que en células crecidas con etanol, la actividad maltasa resultante corresponde con los niveles basales, se podría deducir que las células con gran parte de la actividad hexoquinasa inactivada crecían en estado de desrepresión incluso en presencia de glucosa.

Asumiendo que esta hipótesis fuera cierta y conociendo la regulación de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa, en cultivos que contaran como fuente de carbono glucosa y maltosa, además del inactivador, la actividad maltasa resultante debería ser la correspondiente a inducción al estar el inductor como parte de las fuentes de carbono.

Cuando realizamos el experimento que confirmara nuestra hipótesis, medimos unas actividades  $\alpha$ -glucosidasa en el medio con glucosa y maltosa y distintas concentraciones de Cibacron Blue 3G-A que sólo eran levemente superiores a los valores encontrados en medios con glucosa e inactivador sin alcanzar los niveles de inducción esperados si las células hubieran crecido en estado de desrepresión (Fig. 8).

Concluimos que, en cultivos en discontinuo, con células creciendo con la actividad hexoquinasa disminuida, la capacidad de desencadenar los procesos de represión catabólica permanecen intactos. En *Saccharomyces cerevisiae*, las conclusiones obtenidas de la literatura indican que la inactivación por xilosa de la actividad hexoquinasa significa la incapacidad de la existencia de represión incluso en crecimiento sobre sustratos fermentables (Fernández y col., 1984). En cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con diferente capacidad fosforilante de hexosas controlada por el nivel de expresión de las distintas



**Fig. 8.** Nivel de actividad  $\alpha$ -glucosidasa en relación con la concentración de Cibacron Blue 3G-A en células crecidas con distintas fuentes de carbono. Símbolos: (●) Muestras cultivadas en glucosa. (■) Muestras cultivadas en mezclas glucosa-maltosa. (○) Células de medios con maltosa.

**Tabla IX.** Actividades enzimáticas contenidas en células tratadas con Cibacron Blue 3G-A procedentes de medios con distintas fuentes de carbono<sup>1</sup>.

fuente	Cibacron Blue 3G-A (mM)	Actividad hexoquinasa con		maltosa
		glucosa	fructosa	
Glucosa	0	167±10	179±5.8	0.14±0.10
	0.2	15.4±1.3	15.7±1.8	0.32±0.05
	0.5	12.8±2.1	13.2±2.3	0.36±0.01
	1	13.1±1.7	8.56±5.1	0.36±0.01
	2	7.65±5.2	7.00±0.1	0.323±0.01
Etanol	0	73.6±12	79.6±9.3	2.25±0.15
	0.2	11.1±0.3	75.3±10	1.16±0.10
	0.5	8.78±0.1	5.12±2.3	0.29±0.01
	1	5.11±1.3	20.5±10	0.35±0.01
	2	34.3±10	-	0.35±0.01
Maltosa	0	111±12	116±13	82.5±5.70
	0.2	16.1±2.8	127±2.3	83.1±4.20
	0.5	2.08±1.1	66.7±0.9	38.1±5.10
	1	9.91±0.4	16.9±1.3	24.1±10.3
	2	8.22±0.5	18.6±1.8	52.6±15.3

<sup>1</sup> Actividad determinada en células permeabilizadas. - actividad no determinada.

isoenzimas por dosis génica o por la preparación de híbridos de HK PI y HK PII, se pudo confirmar que el nivel de represión depende directamente de la cantidad de hexoquinasa (Ma y col., 1986; Ma y col. 1989; Rose y col., 1991).

Nuestros intentos para reproducir el efecto inactivador de la actividad hexoquinasa *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae* con la intención de confirmar la desrepresión fisiológica de esta levadura en estas condiciones fueron infructuosos. Los niveles de actividad hexoquinasa y  $\alpha$ -glucosidasa medidos en cultivos con glucosa y colorante fueron los correspondientes a represión y semejantes a los controles sin inactivador (Tabla X). Cuando examinamos la levadura creciendo en presencia de Cibacron Blue 3G-A, comprobamos microscópicamente que el colorante no teñía la levadura. Creemos que la acción inactivadora de las hexoquinasas por parte del Cibacron Blue 3G-A en células de levadura creciendo depende de la capacidad del compuesto para penetrar en la célula.

**Tabla X.** Efecto del Cibacron Blue 3G-A en el control de la represión catabólica de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>1</sup>.

medio	$\alpha$ -glucosidasa	hexoquinasa	
		glucosa 25 mM	fructosa 25 mM
glucosa	4.95	128	132
maltosa	546	187	311
gluc.+Cib. 0.2 mM	4.13	170	183
gluc+Cib. 0.5 mM	3.67	142	188
gluc+Cib. 1 mM	2.65	88	-
gluc+Cib. 2 mM	2.10	109	144

<sup>1</sup> Actividades determinadas en células permeabilizadas recogidas en la fase exponencial de crecimiento.

Los diferentes niveles de actividad  $\alpha$ -glucosidasa encontrados cuando la actividad hexoquinasa fue modulada por Cibacron Blue 3G-A en *Candida utilis*, pueden explicarse por motivos diferentes de la represión catabólica.

Ya se han descrito que los niveles de actividad de distintas enzimas implicadas en el consumo de fuentes de carbono dependen fuertemente de la actividad metabólica de las células. En cultivos en discontinuo, de *Saccharomyces cerevisiae*, controlando la tasa de crecimiento por la adición de glucosamina, se observan distintos niveles de actividad de enzimas sujetas a represión catabólica, como la invertasa (Mc Goldrich y Wheal, 1989). Los resultados comunicados por estos autores no son suficientemente explícitos, pues la glucosamina no solo actúa limitando la velocidad de consumo de glucosa, al ser un competidor de la glucosa en el transporte, sino que también es capaz de inhibir las hexoquinasas de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que el efecto en el nivel de la enzima

estudiada por los autores pudiera depender de factores diversos. Sin embargo, estudios realizados en cultivos continuos con *Saccharomyces cerevisiae*, donde todos los factores ambientales están controlados, se observó la transcripción y actividad de distintas enzimas glucolíticas dependen del flujo metabólico a través de la célula, independientemente del sustrato utilizado en el crecimiento, glucosa o galactosa (Siersktra y col., 1992; Siersktra y col., 1993).

El Cibacron Blue 3G-A no tiene un efecto específico sobre las hexoquinasas de *Candida utilis*. Se ha descrito que el colorante puede resultar un inhibidor de aquellas enzimas con actividad deshidrogenasa (Puri y Roskoski, 1994). Comprobamos *in vitro* este efecto con la actividad alcohol deshidrogenasa de nuestra levadura. La actividad de esta enzima resulta inhibida un 100% cuando la concentración del inactivador de hexoquinasas excede de 500  $\mu\text{M}$  en la muestra (Fig. 9). De todas maneras, no pudimos demostrar que este tipo de enzimas estuvieran severamente afectadas en las células en crecimiento, pues al determinar la tasa de producción de  $\text{CO}_2$  extrarespiratorio; que, en principio sería equimolecular a la producción de etanol fermentativo, no encontramos diferencias sustanciales entre los controles y las células tratadas con el inactivador (Fig. 10A).

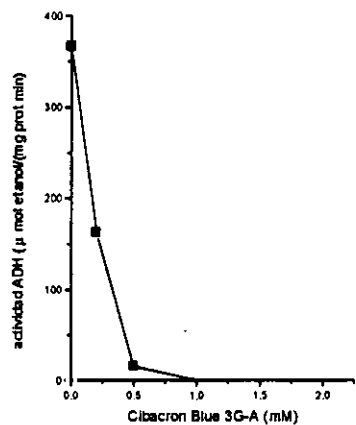
Cuando determinamos los parámetros fundamentales de los crecimientos sobre glucosa realizados con diferentes cantidades de Cibacron Blue 3G-A, encontramos que estos descendían a medida que la concentración de inactivador aumentaba (Tabla XI). Aparentemente, el efecto nocivo sobre el metabolismo del Cibacron Blue 3G-A se manifestaba inmediatamente después de la adición del colorante a una suspensión de células (Fig. 10B). De forma que esta menor actividad metabólica encontrada en las células intoxicadas pudiera deberse no solo al efecto inactivador del Cibacron Blue 3G-A sobre las hexoquinasas de nuestra levadura, sino, también a otra serie de efectos negativos para la célula de difícil cuantificación.

Al preguntarnos por qué la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa no era constante en las diferentes concentraciones de Cibacron Blue 3G-A usadas, encontramos una relación directa entre actividad metabólica de las células *in situ* y nivel de actividad (Fig. 11). También hallamos una relación inversa entre nivel de actividad hexoquinasa total y  $\alpha$ -glucosidasa en cultivos realizados en glucosa. Aunque este al analizar ambas actividades, estas resultaron tener una correlación positiva en cultivos realizados en maltosa y etanol (Fig. 12). De forma que los niveles residuales de ambas actividades, en cultivos con maltosa y etanol, estarían influidas de la misma manera por la velocidad con que la levadura es capaz de consumir el sustrato.

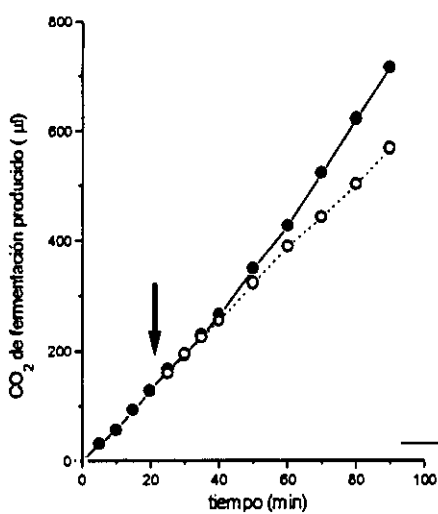
Creemos, por tanto, que la capacidad limitada para consumir las fuentes de carbono incluídas en el medio de cultivo puede determinar tanto el grado de represión como de inducción de la  $\alpha$ -glucosidasa. De esta manera, no podría hablarse de niveles reprimidos o inducidos de una actividad enzimática para una levadura en términos estáticos, sino que estos estarían fuertemente relacionados con la velocidad del flujo metabólico.

**3.3.3. Influencia del paso de fosforilación en el desencadenamiento de la represión catabólica.** La necesidad del paso de la fosforilación de hexosas como requisito para que los fenómenos de represión catabólica se inicien en *Saccharomyces cerevisiae* son conocidos desde hace tiempo (como revisión ver Gancedo, 1992 y Thevelein, 1994), de forma que análogos de glucosa capaces de ser fosforilables, aunque no metabolizables, son

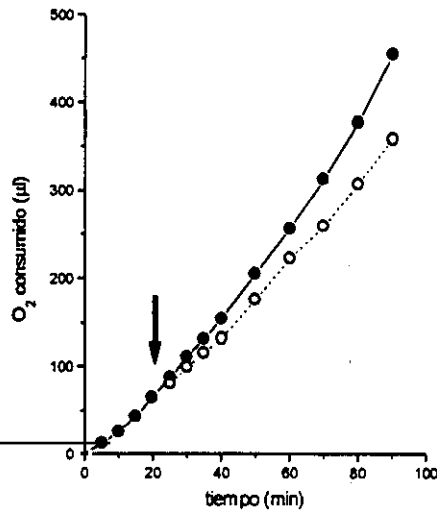




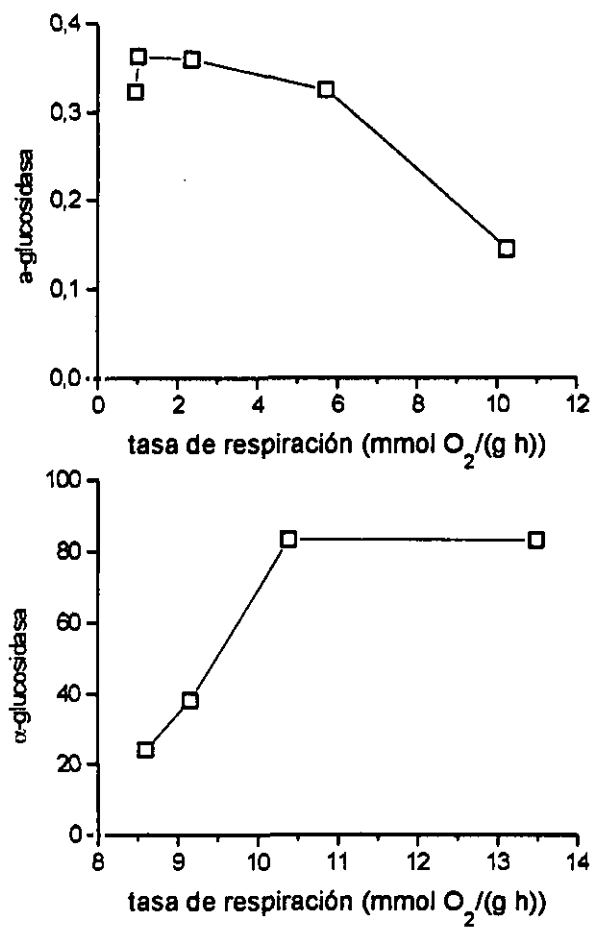
**Fig. 9.** Inhibición de la actividad ADH *in vitro* en extractos crudos tratados con Cibacron Blue 3G-A. La concentración de etanol en las mezclas de reacción fue de 100 mM.



**Fig. 10.** Efecto instantáneo del Cibacron Blue 3G-A en la capacidad fermentativa de *Candida utilis*, determinado mediante ensayos respirométricos, en muestras obtenidas de matraces con escasa agitación. La flecha indica el momento de la adición del colorante.



**Fig. 11.** Efecto instantáneo del Cibacron Blue 3G-A en la capacidad metabólica de *Candida utilis*. Determinación de la tasa de asimilación de oxígeno. La flecha indica el momento de la adición del colorante.



**Fig. 11.** Relación entre la actividad  $\alpha$ -glucosidasa y tasa metabólica en células crecidas en medios con distintas concentraciones de Cibacron Blue 3G-A. **A** Muestras procedentes de medios con glucosa. **B** Muestras procedentes de medios con maltosa.

**Tabla XI.** Parámetros de crecimiento en medios con glucosa y distintas concentraciones de Cibacron Blue 3G-A.

parámetro	concentración de Cibacron Blue 3G-A				
	0 mM	0.2 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.38±0.03	0.18±0.01	0.15±0.02	0.11±0.02	0.13±0.03
Y (g/g)	0.45±0.03	0.35±0.02	0.3±0.03	0.25±0.01	0.21±0.01

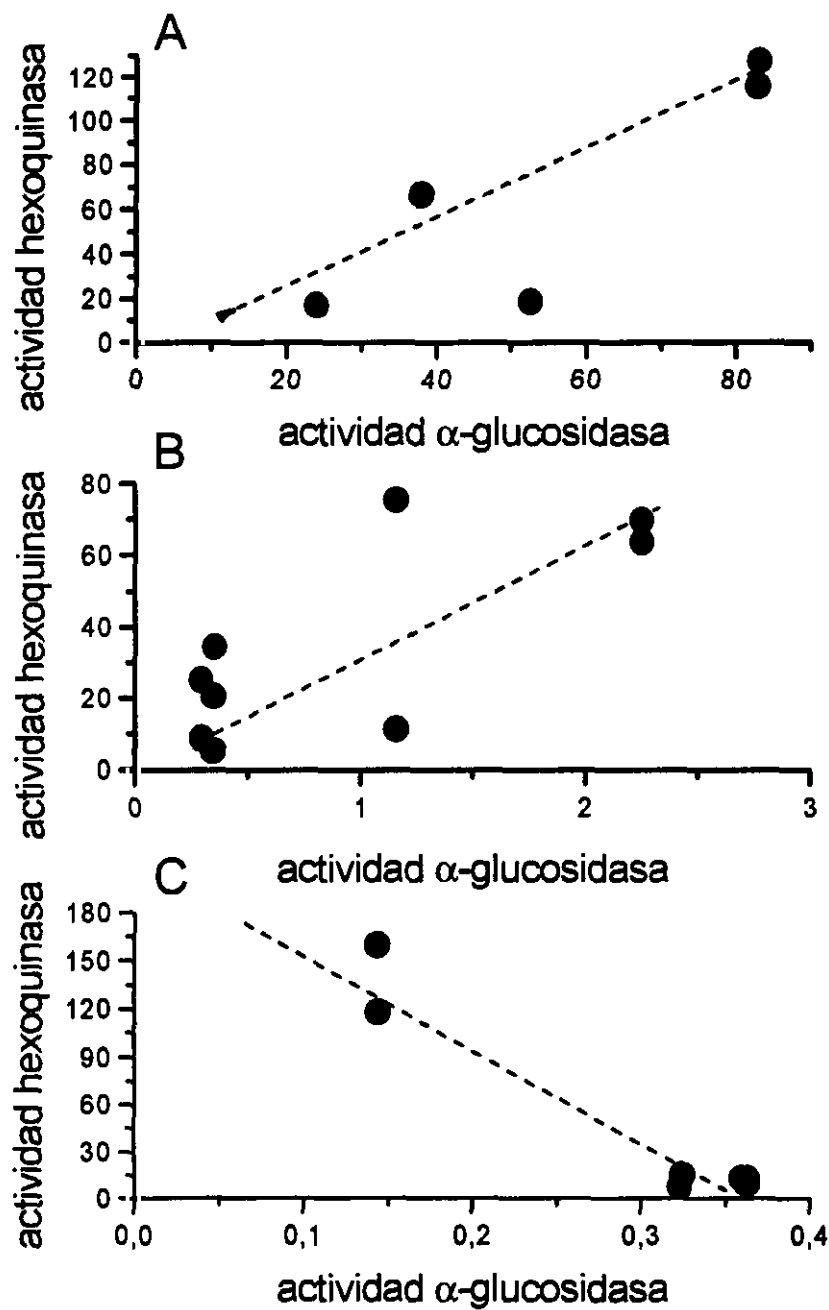


Fig. 12. Relación entre la actividad hexoquinasa residual y actividad  $\alpha$ -glucosidasa en muestras tratadas con Cibacron Blue 3G-A. La línea punteada indica la evolución de la actividad.

aptos para desencadenar represión catabólica. Entre estos sustratos, podemos mencionar la glucosamina (Furst y Michels, 1977), 5-tio-glucosa (Egilsson y col., 1986) y, sobre todo, 2-desoxiglucosa (Zimmermann y Schell, 1977). Los estudios sobre la necesidad de la fosforilación en otras especies de levadura son limitados. Conocemos que no todos los análogos de glucosa en *Candida utilis* son capaces de afectar los mecanismos de consumo de maltosa (Peinado y col., 1987a), por inactivación del transporte.

En este capítulo afrontamos la importancia de la fosforilación de hexosas en la represión de la  $\alpha$ -glucosidasa en nuestra levadura.

Como análogos de glucosa se emplearon 2-desoxiglucosa y 6-desoxiglucosa. La capacidad de ser fosforilados por las hexoquinasas de *Candida utilis* se ensayó en extractos crudos (Tabla XII). Tal como se preveía, solo es fosforilable el análogo que no tiene alterada la posición C-6 (Maitra, 1975). La 6-desoxiglucosa no resulta ser sustrato de las hexoquinasas, incluso a concentraciones de sustrato de 100 mM.

**Tabla XII.** Grado de fosforilación de análogos de glucosa en comparación con la glucosa por las hexoquinasas de *Candida utilis*.

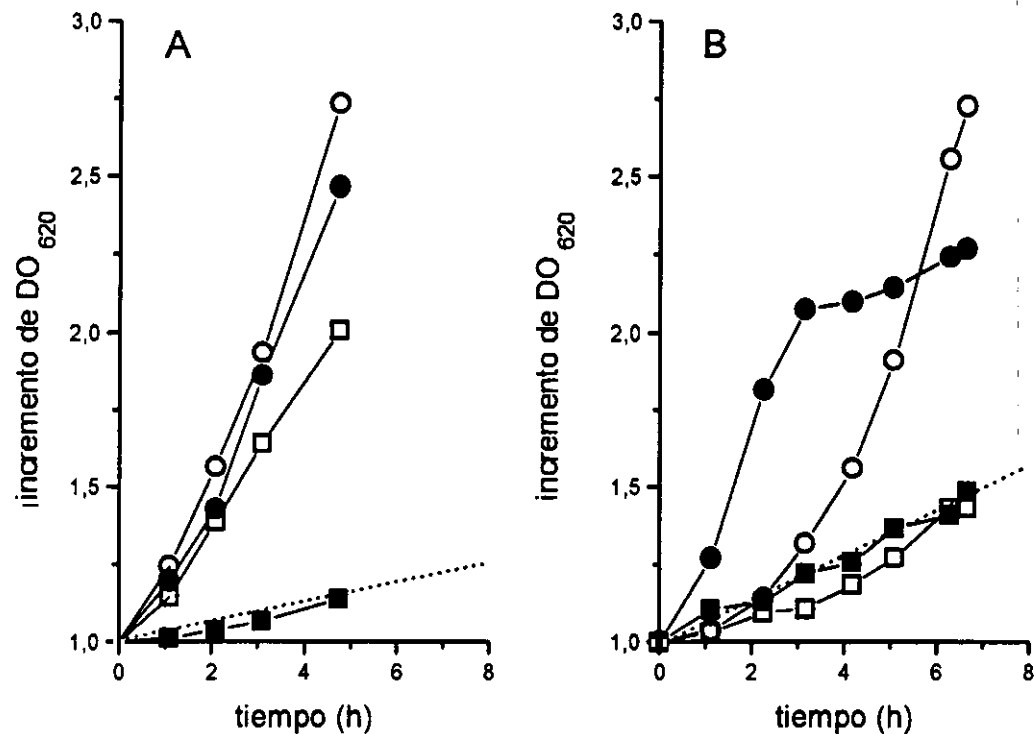
	% de fosforilación respecto al valor obtenido con glucosa				Km/Vmax <sup>1</sup>
	0.1 mM	1 mM	10 mM	100 mM	relativo
2-DOG	1.6	23.7	56.3	58.0	20 (?)
6-DOG	0	0	0	0	-

<sup>1</sup> Km/Vmax relativo hace referencia a la relación  $Km_i \cdot Vmax_{glucosa} / Vmax_i \cdot Km_{glucosa}$ , donde i hace referencia al valor obtenido en Km o Vmax con el uso del análogo determinado. Es un parámetro utilizado para determinar la facilidad con que un sustrato puede ser fosforilado, tal como se describe en Mazón y col. (1975).

La 2-DOG es un sustrato fosforilable fácilmente por las HK de *Saccharomyces*, mientras que resulta ser un mal sustrato para la GK de esta levadura (Barnard, 1975; Maitra, 1970). Los resultados obtenidos por nosotros, se asemejan a los valores que se podrían esperar si en *Candida utilis* encontráramos la misma repuesta para la 2-DOG que en *Saccharomyces*.

Se preinocularon células en presencia de un sustrato represor (glucosa) o inductor (maltosa) que fueron concentradas y transferidas a medios completos con distintas fuentes de carbono, con aireación forzada por bombeo. Se siguió la evolución de la densidad óptica y se tomaron muestras para la determinación de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa. Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 13A y 13B y en la Tabla XIII.

En los experimentos control con glucosa se obtuvieron los resultados esperados. La enzima testigo de represión resultó reprimida cuando las células del ensayo provenían de glucosa y la actividad residual de las células que fueron preinoculadas en maltosa fue cercana a la que esperaríamos en el caso de que la síntesis de la proteína activa no tuviera lugar y se iniciara una dilución de la proteína preexistente en el preinóculo por crecimiento



**Fig. 13.** Capacidad de los análogos de glucosa para desencadenar represión catabólica en muestras preinoculadas en medios con distintas fuentes de carbono. Determinación del incremento de DO<sub>620</sub> en un experimento a lo largo del tiempo. **A** Células procedentes de medios con maltosa. **B** Muestras procedentes de medios con glucosa. Símbolos: (●) Ensayo en medio con glucosa y maltosa. (○) Ensayo en un medio con maltosa. (■) Ensayo en un medio con maltosa y 2-desoxiglucosa. (□) Ensayo en un medio con maltosa y 6-desoxiglucosa. Todas las concentraciones de azúcares fueron de 0.5% (p/v). La línea punteada indica la evolución de la DO de unas células diluídas en agua, donde aparece la evaporación debida al burbujeo.

**Tabla XIII.** Actividad  $\alpha$ -glucosidasa en muestras de cultivos con distintas fuentes de carbono.

Medio de preinoculación	fuentes de carbono del medio	actividad enzimática	
		inicial (tiempo 0 h)	final (tiempo 8 h)
maltosa	glucosa+maltosa	77.9±1.5	23.9±5.3
	maltosa		82.8±1.2
	maltosa+2-DOG		15.9±0.5
	maltosa+6-DOG		82.6±1.0
glucosa	glucosa+maltosa	0.12±0.1	0.30±0.9
	maltosa		67.2±2.8
	maltosa+2-DOG		0.30±0.1
	maltosa+6-DOG		12.7±1.2

<sup>1</sup> Muestras tratadas como en la Fig. 12 A y B.

celular. La presencia de 2-desoxiglucosa implicó la incapacidad de crecer en la levadura en todos los experimentos. Al determinar la actividad enzimática contenida en las distintas muestras observamos como también era la correspondiente a los valores de represión en medios precrecidos con glucosa. Cuando la actividad inicial  $\alpha$ -glucosidasa era alta, la actividad final tras la exposición a la 2-desoxiglucosa era inferior. No se excluye procesos de inactivación o proteólisis, como se ha demostrado para el transporte de maltosa en *Saccharomyces cerevisiae* (Peinado y Loureiro-Dias, 1986; Riballo y col., 1995) y *Candida utilis* (Peinado y col., 1987a).

Los experimentos con 6-desoxiglucosa demostraron que el análogo no alteraba la capacidad de crecimiento en *Candida utilis* sobre mezclas con maltosa, siempre que los mecanismos de consumo del disacárido estuvieran previamente inducidos. Por lo que se pudo descartar que los mecanismos de la señal de inducción estuvieran alterados por la 6-desoxiglucosa. Sin embargo, no se registró ningún crecimiento cuando la biomasa inicial tenía reprimida la  $\alpha$ -glucosidasa, al menos durante el intervalo de tiempo del experimento. Sorprendentemente, la actividad final, al concluir el experimento era superior a la esperable como nivel basal.

Solo existían dos posibles explicaciones a este fenómeno:

1. La 6-desoxiglucosa resulta ser un represor imperfecto, pues es incapaz de demostrar en efecto apreciable cuando la enzima analizada está previamente inducida.
2. La 6-desoxiglucosa no es una molécula que sea capaz de desencadenar represión catabólica.

Con el fin de determinar cuál de las dos hipótesis era cierta, hicimos esta suposición: Asumimos que la inducción de la maquinaria enzimática encargada del consumo de maltosa requiere energía. En el caso que la levadura estuviera en presencia de la mezcla de maltosa y 6-desoxiglucosa, la única fuente de carbono y energía de donde fuera posible obtener esta energía hasta la inducción suficiente sería del análogo. Debido a que la 6-desoxiglucosa no puede ser metabolizada, la levadura carecería de energía suficiente para iniciar el crecimiento sobre maltosa, al menos en tiempos de experimentación relativamente cortos.

En el caso de que nuestra suposición fuera cierta, la adición de una nueva fuente de energía, cuyo consumo estuviera sujeto a represión, permitiría un proceso más rápido de inducción, si la explicación 2. fuera la correcta. Sin embargo, sólo si el análogo fuera represor, la adición de una nueva fuente de carbono no alteraría los resultados conseguidos.

Ensayamos la evolución de la densidad óptica y de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa en un experimento donde se añadió glicerol como fuente de carbono alternativa. Comprobamos previamente que la presencia de glicerol (2%) y 2-desoxiglucosa (0.2%) impedía el crecimiento en discontinuo de *Candida utilis*, por lo que esperamos que la capacidad de metabolizar glicerol estuviera también sujeta a represión catabólica. El glicerol es una fuente de carbono y energía equilibrada en términos de la relación carbono/energía que aporta, por lo que resulta ser un excelente sustrato como fuente de energía en mezclas de fuentes de carbono (Babel y Müller, 1985).

Con estas condiciones experimentales determinamos la capacidad de crecimiento de la levadura sobre glicerol y maltosa, en presencia de 6-desoxiglucosa. La actividad

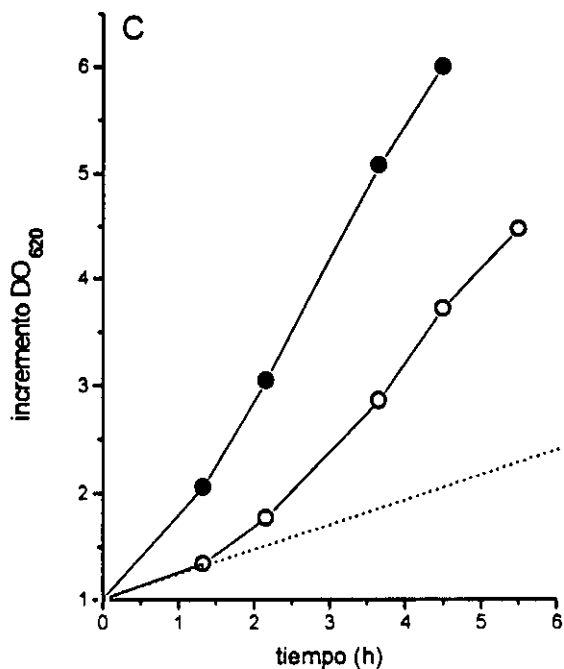
específica final conseguida era superior a la obtenida en ausencia de glicerol (Tabla XIV y Fig. 13C) y la levadura recuperaba la capacidad de crecer. Por lo tanto, concluimos que la 6-desoxiglucosa es incapaz de desencadenar represión catabólica. La explicación del porqué células precrecidas en estado de represión fueran incapaces de crecer en mezclas de maltosa y análogo cuando no existía ninguna fuente de carbono alternativa se encontró en la insuficiente actividad  $\alpha$ -glucosidasa para sustentar el crecimiento sobre maltosa. Tomando el valor de proporción de proteína en el peso seco de la levadura del 50%, que el rendimiento sobre maltosa estuviera cercano a 0.5 g/g, y que la posibilidad de asimilar maltosa residiera en la velocidad de hidrólisis de maltosa; entonces, la tasa de crecimiento máxima esperada sería de  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , que en términos experimentales se asumiría como ausencia de crecimiento.

Al igual que en *Saccharomyces cerevisiae* donde las distintas respuestas desencadenadas por sustratos fermentables tienen un origen, en su mayoría, en el metabolismo temprano de los azúcares (Thevelein, 1994), en *Candida utilis*, la señal para desencadenar la represión catabólica debería situarse en uno de los pasos iniciales del metabolismo de hexosas.

La utilización de 6-desoxiglucosa como sustrato análogo de glucosa no fosforizable y que es incapaz de disparar la represión puede ser discutida, ya que cabe la posibilidad de que la señal que reconozca la levadura para iniciar la respuesta de represión después de la adición de glucosa no sea semejante a la que se obtendría con 6-desoxiglucosa. En concreto, es posible que el análogo no sea transportado con la efectividad con que lo es la glucosa y que las cinéticas de transporte de ambos azúcares no sean semejantes.

Hasta el momento, sabemos que este azúcar es un sustrato para los transportadores de glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* (Kotyk y col., 1975; Romano, 1982; Bisson y Fraenkel, 1983; Schuddemat y col., 1988) y existe discrepancias respecto a cómo el análogo puede simular las cinéticas de transporte de glucosa. Romano (1982) indica que el análogo y el sustrato metabolizable comparten semejantes valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para el transporte, mientras que Bisson y Fraenkel (1983) muestran parámetros de transporte diferentes para ambos sustratos, siendo sustrato de los sistemas llamados constitutivos de transporte de glucosa en células crecidas en glucosa. Estos mismos autores indican, que al igual que *Kluyveromyces marxianus*, este análogo no resulta específico para los sistemas de transporte de glucosa, pues también es sustrato para el sistema inducible de transporte de galactosa (De Bruijne y col., 1988). Aparentemente, el análogo no resulta ser un buen sustrato para los sistemas de transportes de glucosa de *Saccharomyces cerevisiae* (Weusthuis y col., 1994b).

Las conclusiones bibliográficas previas anuncian la posibilidad de que la 6-desoxiglucosa no sea transportada lo suficientemente como para iniciar la represión catabólica. Los datos que se poseen sobre la capacidad para transportar 6-desoxiglucosa en *Candida utilis* son escasos. Solo se ha comunicado que es una molécula susceptible de ser acumulada hasta en un orden de 70 veces respecto a la concentración externa (van Urk y col., 1989) en el interior de la célula, pues nuestra levadura posee un sistema de transporte no reversible de glucosa si la célula se mantiene energizada (van den Broek y col., 1995). Es un sistema de transporte activo de alta afinidad (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989). No se dispone de las características de transporte a altas concentraciones del análogo que hubieran permitido comparar los parámetros de transporte correspondientes a los



**Fig. 13C.** Relación de la 6-desoxiglucosa con la represión catabólica en *Candida utilis*. Experimento similar al mostrado en las Fig. 13A y B, con células crecidas en medios con maltosa-6-desoxiglucosa-glicerol. Todas las concentraciones iniciales fueron 0.5% (p/v). Símbolos: (●) Muestras preinoculadas en medios con maltosa. (○) Muestras preinoculadas en medios con maltosa.

**Tabla XIV.** Actividad  $\alpha$ -glucosidasa en células preinoculadas en medios con distintas fuentes de carbono y crecidas en medios maltosa-6-DOG-glicerol<sup>1</sup>.

medio de preinoculación	actividad $\alpha$ -glucosidasa	
	inicial (tiempo 0h)	final (tiempo 6h)
glucosa	0.13±0.1	62.9±3.8
maltosa	81.6±0.9	82.9±0.7

<sup>1</sup> Muestras tratadas como en la Fig. 13C.



---

sistemas de difusión facilitada de nuestra levadura.

Se podría formular una hipótesis donde la señal para el inicio de la represión catabólica en *Candida utilis* se sitúe en un paso tan temprano del metabolismo como es el transporte, si se confirmara que la 6-desoxiglucosa no entrara al interior celular con efectividad. Sin embargo, los estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* no demuestran que el transporte esté implicado en la cadena de la represión catabólica. Más bien al contrario, en dicha levadura, la capacidad para transportar glucosa parece estar bajo el control de la represión catabólica, puesto que el componente de alta afinidad del transporte es reprimible por altas concentraciones de glucosa (Bisson y Fraenkel, 1983b; Bisson y col., 1987, Bisson, 1988). Por lo que puede presumirse que el paso de transporte de glucosa no sea el desencadenante de la represión catabólica.

En cualquier caso, parece incuestionable que, para la existencia de la represión catabólica, es preciso la fosforilación del sustrato que desencadena la represión. La relación de las reacciones finales de la glucólisis se pueden descartar, puesto que la 2-desoxiglucosa al entrar en la glucólisis provoca en descenso de los niveles de ATP libres. Este es uno de los dos mecanismos que causan la toxicidad del análogo (Gancedo y Serrano, 1989). El nucleótido queda atrapado en forma de 2-desoxiglucosa-6-P, de forma que se imposibilitan las reacciones subsiguientes que requiere ATP. De esta manera, según las conclusiones que se pueden extraer de la exposición de los resultados de este capítulo, la relación de las hexoquinasas en el control de represión catabólica no se puede descartar.

### 3.4. ¿Tienen las hexoquinetas de *Candida utilis* el mismo papel en el control de represión catabólica que el atribuido para estas enzimas en *Saccharomyces cerevisiae*?

Como sumario de las conclusiones expuestas en los 3 apartados anteriores podemos desarrollar una tabla con las similitudes y diferencias encontradas al comparar las actividades para la fosforilación de hexosas en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* desde el punto de vista cinético, de regulación por metabolitos, por fase de crecimiento y fuente de carbono (Tabla XV).

**Tabla XV.** Comparación de la regulación fisiológica de las hexoquinetas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*. Influencia en el control de represión catabólica.

		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	estado fisiológico	<i>Candida utilis</i>
		F/G total <sup>1</sup>		F/G total
fase de cultivo en glucosa	exponencial	1.2-1.6	represión	1.1 <sup>2</sup>
	estacionario	0.6-0.7	desrepresión	1.0 <sup>2</sup>
fuente de carbono	hexosas	1.2-1.6	represión	1.1-1.0 <sup>3</sup>
	oxidable	0.6-0.7	desrepresión	1.0-0.8 <sup>3</sup>
		<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i> <sup>3</sup>	
efectores fisiológicos				
inhibición por xilosa		+ <sup>4</sup>	-	
inactivación por xilosa		+ <sup>5</sup>	-	
inhibición por ADP		+ <sup>6</sup>	+	
inhibición por AMP		+ <sup>6</sup>	-	
utilización de ATP libre de Mg <sup>2+</sup>		- <sup>7</sup>	+	
inhibición por trehalosa-6-P		+ <sup>8</sup>	+	

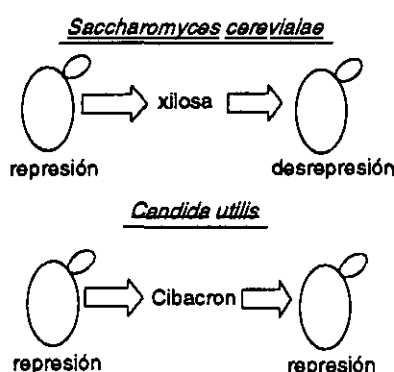
<sup>1</sup> Datos de Fernández y col., (1985); Maitra (1975); Barnard (1975). <sup>2</sup> Datos de Espinel (1991). <sup>3</sup> Este trabajo.

<sup>4</sup> Datos de Fernández y col. (1985). <sup>5</sup> Datos de Fernández y col. (1985) y Fernández y col. (1986). <sup>6</sup> Datos de Maitra (1975), Dombek y Ingram (1988), Woolfitt, y col. (1988) y Alterthum y col. (1989). <sup>7</sup> Datos de Moreno y col. (1986). <sup>8</sup> Datos de Blázquez y col. (1993).

Las diferencias son sustanciales, fundamentalmente en los estudios de la regulación fisiológica de las hexoquinetas. Se ha comprobado que no existe necesariamente alta

actividad hexoquinasa en aquellas células que crecen en estado de represión en *Candida utilis*, siendo este dato contrario al encontrado *in vivo* en la levadura patrón de estos estudios.

De igual manera no hemos podido demostrar que reducidos niveles de fosforilación impliquen la desrepresión, al estudiar el estado de represión en células creciendo artificialmente con la mayor parte de la actividad hexoquinasa inactivada. Aunque los niveles residuales de actividad fosforilante de hexosas se relaciona inversamente con el nivel de actividad  $\alpha$ -glucosidasa en cultivos sobre glucosa, sin embargo esta relación resulta positiva cuando los cultivos se realizaron sobre fuentes de carbono no represoras (Diagrama 1).



De esta manera no parece directa la relación entre actividad catalítica de fosforilación y nivel de represión, aunque en otras levaduras se ha demostrado la relación que tienen las hexoquinasas en el control de represión y, en alguno casos, se ha propuesto la importancia de la cantidad de enzima y velocidad de fosforilación en el control de represión (Ma y col., 1986; Ma y col. 1989; Rose y col., 1991).

De todas maneras, no podemos distinguir la existencia de otras funciones contenidas en la hexoquinasas, además de la meramente fosforilante de hexosas, por la cual estas enzimas pudieran controlar el nivel de represión. Distintos autores sugieren esta posibilidad en las enzimas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entian y Frölich (1984) aislaron el mutante de *Saccharomyces cerevisiae* *hex1<sup>r</sup>* que contenía la actividad catalítica hexoquinasa aunque había perdido la capacidad de represión catabólica. Los autores propusieron que en la enzima HK PII estaban contenidas dos tipos de actividad: una catalítica, implicada en la glucólisis, y otra reguladora con función en el control de represión. Finalmente, este grupo no pudo averiguar dónde reside físicamente esta función. Cómo interviene la proteína en la represión mediante esta hipotética nueva función ha sido discutido por diferentes autores. Ya se ha comunicado que las hexoquinasas pueden actuar como fosfotransferasas en determinadas condiciones intercambiando los residuos fosfatos entre el par ATP-ADP (Maitra, 1975), aunque esta propiedad no parece tener relación con la represión catabólica. Además, la isoenzima PII es susceptible de ser fosforilada como mecanismo de inactivación de la xilosa (Fernández y col., 1986b). Más adelante, se descubrió que esta proteína contiene una actividad autofosforilante *in vitro* (Fernández y col., 1988) y también puede ser fosforilada por quinasas desconocidas *in vivo*

en un proceso aparentemente inhibido por protein quinasas dependientes de AMPc (Vojtek y Fraenkel, 1990).

Se ha discutido la relevancia de los procesos de fosforilación como el mecanismo por el cual las hexoquinasas controlan la represión catabólica y es independiente de la fosforilación inducida por xilosa (Vojtek y Fraenkel, 1990). Aunque se encuentra que el mayor grado de fosforilación de la hexoquinasa PII *in vivo* corresponde a los estados de desrepresión, este fenómeno no es exclusivo de esta isoenzima. También la hexoquinasa PI y la proteína mutante presuntamente inactiva hxx2-1 son fosforilables. Sin embargo la GK no parece sufrir estos procesos de fosforilación (Vojtek y Fraenkel, 1990). Cuando se analizó la relación de grado de fosforilación de la proteína y represión, no se encontró una relación directa, aunque sí existía cuando se comparó la velocidad de fosforilación con la aparición del sistema de alta afinidad de transporte de glucosa. Por otro lado, parece que un residuo fundamental para la fosforilación es la Ser-15, contenida en el extremo N-terminal de la proteína (Kriegel y col., 1994). Ma y Botstein (1989) encontraron que esta porción de la proteína era prescindible para la existencia de represión catabólica. Además la proteína fosforilada no cambia los parámetros cinéticos de fosforilación de hexosas cuando se les comparó con la proteína desfosforilada (Vojtek y Fraenkel, 1990).

De esta manera, no se ha creído que la autofosforilación o la forma fosforilada de la hexoquinasa PII estén implicadas en el control de fosforilación. Sin embargo, se ha comunicado que la hexoquinasa PII puede actuar, a su vez, como una proteína quinasa (Herrero y col., 1989). Los autores sugieren que este sería el mecanismo por el cual las hexoquinasas pueden ejercer el control de los circuitos de represión. La capacidad de fosforilar histona es superior en la proteína de células crecidas en altas concentraciones de glucosa que a bajas concentraciones de ella. La isoenzima contenida en el mutante con actividad fosforilante hexoquinasa PII, pero incapaz de controlar la represión catabólica, no manifiesta esta actividad proteína quinasa, lo que sustentaría la idea sobre el mecanismo de control expuesto por Herrero y col. (1989).

Nosotros no encontramos diferencias que nos permitieran distinguir desde un punto de vista bioquímico las isoenzimas de *Candida utilis* en represión (fase exponencial sobre glucosa) y en desrepresión (fase estacionaria de cultivos con glucosa); tanto por las concentraciones de tampón a las cuales eluían de las columnas cromatográficas, como por su movilidad relativa electroforética en condiciones nativas (Espinell, 1991). Herrero y col. (1989), Vojtek y Fraenkel (1990) y Kriegel y col. (1994) comunicaron que la movilidad electroforética de las isoenzimas desnaturalizadas no cambiaba en función de su nivel de fosforilación. En cualquier caso, las condiciones experimentales utilizadas por los autores imponían la desnaturalización de la muestra. Nosotros tampoco hemos encontrado diferencias respecto a la movilidad de las enzimas contenidas en *Candida utilis* en electroforesis con muestras conteniendo las isoenzimas activas extraídas en estados de represión y desrepresión (fase estacionaria de crecimientos en glucosa) (Espinell, 1991).

Por todo lo anteriormente expuesto, aunque no esperamos que un alto nivel de actividad catalítica de las hexoquinasas de *Candida utilis* esté implicado en el control de represión, no excluimos que éste se ejerza por otro tipo de actividad contenida en las proteínas. La localización de esta presunta actividad se torna compleja al carecer de suficientes herramientas de estudios moleculares en *Candida utilis* durante el tiempo de experimentación.

### 3.5. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Candida utilis* con fallos en el control de represión catabólica.

3.5.1. **Aislamiento de mutantes desreprimidos.** Utilizamos dos tipos de técnicas: una que no requirió un proceso mutagénico previo y otra donde las células fueron seleccionadas después de un tratamiento mutagénico aleatorio con un agente alquilante, según lo expuesto en el apartado ... de Material y métodos.

3.5.1.1. **Selección con EMS.** Conseguimos 74 cepas de presuntos mutantes resistentes a la presencia de 2-desoxiglucosa. Ninguno de ellos presentó una actividad cualitativamente más alta que la cepa parental cuando fueron crecidas en medios con glucosa ni cuando lo hicieron en mezclas glucosa-maltosa. Además ninguna de las cepas seleccionadas reprodujo la capacidad de resistir la 2-desoxiglucosa después de 2 semanas de trabajo.

3.5.1.2. **Selección de mutantes espontáneos.** Utilizamos el método de Zimmermann y Schell (1977), con 2-desoxiglucosa como agente para la selección de mutantes desreprimidos. A partir de cultivos en la fase exponencial de crecimiento sobre glucosa (según lo expuesto en Material y Métodos), seleccionamos 21 cepas presuntamente defectuosas en el control de represión catabólica. Al examinar la actividad  $\alpha$ -glucosidasa, sólo tres fueron seleccionadas para su estudio posterior, pues después de 2 semanas de trabajo, la rotulada como aislamiento 18 perdió la capacidad de crecer sobre el análogo de glucosa y los niveles de actividad de la enzima control fueron semejantes a la cepa parental (Tabla XVI).

**Tabla XVI.** Resultados iniciales del aislamiento y selección de cepas desreprimidas de *Candida utilis*.

aislado nº	crecimiento en medios con <sup>1</sup> :			actividad $\alpha$ -glucosidasa en medios con <sup>2</sup> :		
	glucosa	fructosa	maltosa	glucosa	maltosa	glucosa-maltosa
1	+	+	+	rápida	rápida	rápida
2	+	+	+	rápida	rápida	rápida
9	+	+	+	rápida	rápida	rápida
3092	+	+	+	lenta	rápida	lenta

<sup>1</sup> El signo positivo indica crecimiento rápido en los medios señalados.

<sup>2</sup> Determinación de la actividad realizada en términos cualitativos. Se observó el tiempo necesario para desarrollar color amarillo en muestras obtenidas de los medios señalados, según el apartado de Material y Métodos...

La escasa proporción de mutantes resistentes al análogo tóxico con un fenotipo presuntivamente desreprimido, es común en levadura. La aparición de mutantes o

actividades que implican resistencia a la 2-desoxiglucosa es frecuente en las levaduras (Heredia y Heredia, 1988).

Los trabajos iniciales de caracterización de los aislamientos se efectuaron con los marcados con los números 1, 2 y 9. Cada uno de ellos conservaron la capacidad de crecer en los cultivos de mantenimiento de mutantes durante las etapas iniciales de estudio. Las cepas aisladas fueron denominadas SDM, tomando las iniciales de las palabras inglesas *Spontaneous Derepressed Mutant*, seguido del número de aislamiento.

**3.5.2. Estudio del alcance de la desrepresión en los mutantes desreprimidos en cultivos en discontinuo.** Fue preciso determinar qué circuitos para el consumo de otras fuentes de carbono distintas a hexosas estaban afectadas en las cepas aisladas. Las enzimas estudiadas fueron, básicamente, los circuitos iniciales del consumo de otros azúcares:  $\alpha$ -glucosidasa, invertasa, transporte activo de glucosa, además de la actividad hexoquinasa.

En otras levaduras los estudios las posibles vías afectadas por la represión son más amplias (Serrano y Gancedo, 1989; Gancedo, 1992; Trumbly, 1992; Entian y Barnett, 1992; Thevelein, 1994), incluyendo las vías gluconeogénicas, de los ácidos tricarboxílicos, enzimas del ciclo del glioxilato y amilasas. No fue necesario tal amplitud en el estudio, por diversos motivos:

*Candida utilis* no muestra represión del metabolismo respiratorio, pues, incluso a altas concentraciones de glucosa, la mayor parte del azúcar es oxidado y es una levadura Crabtree negativa. Por otro lado, se ha descrito, que la represión catabólica no afecta al consumo simultáneo de determinadas fuentes gluconeogénicas, como etanol, y glucosa (Vraná y col., 1989; Weusthuis y col., 1994a).

Informaciones previas indicaban que tras un crecimiento sobre etanol, la capacidad para consumir glucosa estaba muy disminuida por la baja actividad de la piruvato quinasa, una de las enzimas que catalizan una reacción irreversible en la glucólisis (Gancedo y col., 1967). Nosotros comprobamos, sin embargo, (ver apartado 3.6.2.3. y 3.6.2.4.) que la capacidad de la levadura para consumir glucosa no es dependiente de la fuente de carbono de crecimiento, sea gluconeogénica o no. También se han descrito el nivel de actividad de distintas enzimas implicadas en diferentes vías, cuando las células han sido crecidas en continuo, sobre distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Bruinenberg y col., 1983a). Los autores comunican que enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (iniciadora del ciclo de las pentosa), la fructosa-1,6-bisfosfatasa (enzima gluconeogénica), la alcohol deshidrogenasa, o la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD (del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) presentan niveles constantes de actividad a una misma tasa de dilución, independientemente de la fuente de carbono. Otras, al contrario, dependen de la fuente de carbono, como la fructosa-6-fosfato quinasa (coincidiendo con las observaciones descritas en Gancedo y Serrano (1989)), la acetaldéhid deshidrogenasa y la pareja de enzimas situadas en los pasos iniciales del metabolismo de xilosa: la xilosa reductasa y la xilitol deshidrogenasa (Bruinenberg y col., 1983a).

No estudiamos la posible represión de las enzimas del ciclo del glioxilato, puesto que se ha descrito que adquieren relevancia cuando en levaduras productoras de aminoácidos y derivados del Ciclo de Krebs, donde la existencia de reacciones anapleróticas son importantes como relleno de los intermediarios no utilizados para la respiración (Gancedo y Serrano, 1989). Por otro lado, el mecanismo de represión de las

enzimas envueltas en este ciclo parece que escapa a los circuitos generales de represión de las vías de consumo de azúcares distintos a glucosa (Gancedo, 1992), que son los que esta Tesis tiene propuesto estudiar. Por otro lado, existen trabajos recientes que indicarían que el complejo enzimático de este ciclo no estaría completo en *Candida utilis* (Sokolov y col., 1996).

Finalmente, nuestra levadura es incapaz de crecer sobre almidón (Barnett y col., 1990; Linardi y col., 1993), por lo que carece de sentido cualquier estudio en el tema.

3.5.2.1.  **$\alpha$ -glucosidasa.** Efectuamos los estudios preliminares cuantitativos de actividad  $\alpha$ -glucosidasa cuando los aislamientos fueron crecidos sobre distintas fuentes de carbono (Tabla XVII).

**Tabla XVII.** Actividad  $\alpha$ -glucosidasa determinada en cultivos discontinuos con distintas fuentes de carbono<sup>1</sup>.

cepa	fase de crecimiento	medio con:		
		glucosa	maltosa	acetato
SDM-1	exponencial	93 $\pm$ 3.5	91 $\pm$ 2.7	73 $\pm$ 1.9
	estacionaria	67 $\pm$ 2.5	65 $\pm$ 1.8	54 $\pm$ 2.9
SDM-2	exponencial	81 $\pm$ 3.8	87 $\pm$ 4.7	79 $\pm$ 2.1
	estacionaria	53 $\pm$ 1.1	84 $\pm$ 3.5	55 $\pm$ 2.2
SDM-9	exponencial	83 $\pm$ 4.0	89 $\pm$ 8.1	80 $\pm$ 1.2
	estacionaria	58 $\pm$ 2.2	60 $\pm$ 3.7	57 $\pm$ 8.0
3092	exponencial	0.1 $\pm$ 0.05	89 $\pm$ 9.1	3.6 $\pm$ 0.5
	estacionaria	9.6 $\pm$ 0.7	57 $\pm$ 8.1	3.4 $\pm$ 2.1

<sup>1</sup> Valores determinados en medios YPD. Los valores medidos en el medio mineral K no difirieron sustancialmente de los referidos en esta tabla.

Al comparar los resultados en los crecimientos sobre maltosa, comprobamos que todas las cepas contenían semejante actividad máxima. Los mecanismos de inducción parecían estar alterados en las cepas mutantes, pues obtuvimos en medios sin inductor unos niveles de actividad semejante a los que previamente se encontraron con maltosa. Los resultados más sorprendentes se encontraron al analizar los valores de actividad de células crecidas en glucosa. La actividad encontrada fue del mismo orden de magnitud que en presencia del inductor de la actividad en la cepa parental.

Todos estos datos nos permitieron determinar que todas las cepas seleccionadas presentaban una actividad  $\alpha$ -glucosidasa completamente desregulada. No solo los controles

de represión habían sido evitados en los mutantes, sino que también carecían de regulación en los procesos de inducción, de forma que la expresión enzimática parece ser constitutiva.

De esta manera, para obtener altos niveles de actividad  $\alpha$ -glucosidasa en los mutantes no resultaría necesario la adición de maltosa

**3.5.2.2. Invertasa.** Los resultados obtenidos se representan en la **Tabla XVIII**. Tal como se podía esperar por el método de aislamiento, la actividad invertasa externa en los mutantes es mayor en crecimientos sobre glucosa que la encontrada en el control con la cepa parental. Las células solo podrían crecer a partir de la única fuente asimilable de carbono, la rafinosa. Este trisacárido solo puede ser sustrato de la invertasa (Barnett, 1981), aunque con baja afinidad. Es preciso altos niveles de enzima para procurar un crecimiento efectivo sobre este azúcar. Esto puede explicar por qué la utilización de este método de selección de mutantes conduce al aislamiento de cepas afectadas en el control de represión de la invertasa (Zimmermann y Schell, 1977), independientemente de que el método impone en *Saccharomyces cerevisiae* el aislamiento de cepas defectuosas en la fosforilación por las hexoquinasas y de la relación en el control de represión de la invertasa por las hexoquinasas.

**Tabla XVIII.** Actividad invertasa determinada en cultivos discontinuos con distintas fuentes de carbono<sup>1</sup>.

cepa	fase de crecimiento	medio con:		
		glucosa	maltosa	acetato
SDM-1	exponencial	15.4 $\pm$ 2.5	35.2 $\pm$ 5.1	55.3 $\pm$ 3.7
	estacionaria	18.4 $\pm$ 3.1	56.7 $\pm$ 6.6	35.8 $\pm$ 2.1
SDM-2	exponencial	15.3 $\pm$ 1.9	38.8 $\pm$ 10.1	54.2 $\pm$ 4.9
	estacionaria	25.5 $\pm$ 5.1	40.3 $\pm$ 8.0	36.4 $\pm$ 2.3
SDM-9	exponencial	14.6 $\pm$ 2.0	25.3 $\pm$ 2.1	55.3 $\pm$ 5.3
	estacionaria	27.7 $\pm$ 5.0	35.6 $\pm$ 3.4	29.2 $\pm$ 1.7
3092	exponencial	8.3 $\pm$ 0.9	24.3 $\pm$ 0.9	57.8 $\pm$ 5.1
	estacionaria	11.7 $\pm$ 1.4	22.3 $\pm$ 3.2	17.2 $\pm$ 1.1

<sup>1</sup> Valores determinados en medios YPD. Los valores medidos en el medio mineral K no difirieron sustancialmente de los referidos en esta tabla.

Al comparar los niveles obtenidos en crecimientos sobre una fuente de carbono represora (glucosa) con los registrados en medios con acetato y sacarosa, comprobamos que la represión de la actividad en los mutantes no es completa.

**3.5.2.3. Transporte activo de glucosa.** *Candida utilis* posee un sistema de alta



afinidad, semejante por su afinidad a los encontrados en otras levaduras (van Urk y col., 1989). Este es un sistema de transporte activo (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989; van den Broek y col., 1995), donde la estequiometría del transporte es 1:1 ( $H^+$ :glucosa), (Peinado y col., 1989). Los sistemas de transporte activo están ampliamente extendidos entre las levaduras, sean dentro del género *Candida* (Spencer-Martins y van Uden, 1985) o, en general, en todas las levaduras (Loureiro-Dias, 1988).

El sistema de alta afinidad en *Candida utilis* resulta ser reprimible por glucosa (Peinado y col., 1989) y el nivel de actividad de este sistema fue estudiado en los mutantes después de ser crecidos en glucosa y en etanol (Tabla XIX).

**Tabla XIX.** Actividad del transporte activo de glucosa en las cepas desreprimidas y en la parental. Determinación en cultivos discontinuos<sup>1</sup>.

cepa	fase de crecimiento	medio con:	
		glucosa	etanol
SDM-1	exponencial	0.17±0.02	0.23±0.01
	estacionaria	0.06±0.01	-
SDM-2	exponencial	0±0	0.38±0.02
	estacionaria	0.21±0.02	-
SDM-9	exponencial	0±0	0.36±0.02
	estacionaria	0.16±0.01	-
3092	exponencial	0±0	0.24±0.01
	estacionaria	0.07±0.03	-

<sup>1</sup> Valores determinados en medio K. - no determinado.

Como esperábamos, no fue posible determinar pH-métricamente ninguna actividad en la cepa salvaje en crecimientos sobre glucosa. Los mismos resultados fueron obtenidos en los ensayos con las cepas mutantes SDM-2 y SDM-9.

Sin embargo, se obtuvieron señales de basificación en cultivos sobre glucosa con el mutante SDM-1. El nivel de actividad, en estas condiciones, no alcanzó los valores que obtuvimos en ensayos con la cepa parental en ausencia de represión. Dedujimos que la actividad de este sistema de transporte también estaba parcialmente desreprimido en *Candida utilis* SDM-1.

De acuerdo a los resultados expuestos, concluimos que los sistemas de represión afectados no coincidían en las cepas mutantes, en estudios *in vitro*.

**3.5.3. Estudio de las características de crecimiento en discontinuo de los mutantes desreprimidos.** Después de confirmar que la desrepresión de los mutantes abarcaba a los sistemas de consumo de otras fuentes de carbono, afrontamos el estudio de los parámetros de crecimiento de los mutantes en cultivos en discontinuo, utilizándose para ello diversos sistemas de cultivo y distintas fuentes de carbono.

**3.5.3.1. Crecimientos en matraz y micropocillo.** Empleamos fuentes de carbono represoras (glucosa y fructosa), disacáridos (maltosa y sacarosa) y gluconeogénicas (etanol, acetato y glicerol). Los medios de cultivo utilizados fueron tanto complejos (YPD) como sintéticos (medio K). Los resultados se expresan en la **Tabla XX**.

**Tabla XX.** Tasas de crecimiento determinadas en cultivos complejos y sintéticos con distintas fuentes de carbono.

medio	cepas			
	3092	SDM-1	SDM-2	SDM-9
glucosa (medio K)	0.41±0.03	0.38±0.01	0.36±0.01	0.37±0.01
glucosa (medio YPD)	0.28±0.02	0.27±0.02	0.25±0.01	0.28±0.01
fructosa (medio K)	0.41±0.01	0.39±0.02	0.35±0.01	0.37±0.02
fructosa (medio YPD)	0.27±0.01	0.27±0.01	0.24±0.01	0.27±0.01
manosa (medio K)	0.40±0.02	0.41±0.01	0.35±0.02	0.36±0.01
manosa (medio YPD)	0.29±0.01	0.28±0.01	0.25±0.02	0.26±0.02
maltosa (medio K)	0.29±0.01	0.27±0.03	0.26±0.01	0.27±0.01
maltosa (medio YPD)	0.25±0.02	0.26±0.01	0.25±0.01	0.26±0.01
sacarosa (medio K)	0.39±0.02	0.39±0.01	0.35±0.02	0.34±0.03
sacarosa (medio YPD)	0.29±0.02	0.27±0.03	0.27±0.02	0.28±0.01
etanol (medio K)	0.32±0.02	0.30±0.01	0.30±0.02	0.31±0.01
etanol (medio YPD)	0.29±0.01	0.29±0.02	0.28±0.01	0.27±0.02
acetato (medio K)	0.32±0.03	0.31±0.03	0.30±0.02	0.29±0.03
acetato (medio YPD)	0.26±0.01	0.25±0.02	0.25±0.03	0.26±0.03
glicerol (medio K)	0.31±0.03	0.33±0.02	-	-
glicerol (medio YPD)	0.30±0.04	0.32±0.02	-	-

<sup>1</sup> La concentración de las fuentes de carbono fue del 0.5% (p/v). - no determinado

Los resultados contenidos en la el apartado 3.5.2 indicaban que el mutante SDM-1

presentaba defectos más amplios que los otros mutantes aislados. Por ello, decidimos estudiarlo más extensamente con la utilización de cultivos en placas micropocillo (Tabla XXI).

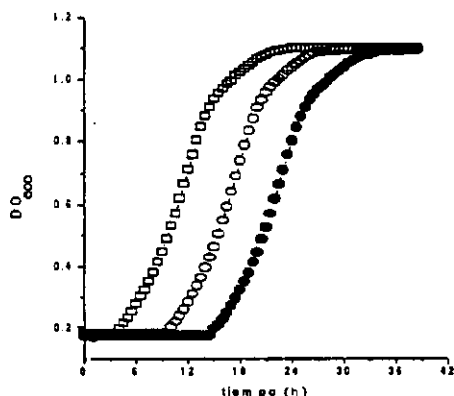
**Tabla XXI.** Influencia del oxígeno en la tasa de crecimiento en placas micropocillo. Comparación entre las cinéticas de crecimiento de la cepa parental y SDM-1<sup>1</sup>.

medio	3092		SDM-1	
	limitación de O <sub>2</sub>	sin limitación de O <sub>2</sub>	limitación de O <sub>2</sub>	sin limitación de O <sub>2</sub>
glucosa	0.17	0.27	0.10	0.23
fructosa	0.16	0.27	0.09	0.24
manosa	0.15	0.28	0.11	0.23
maltosa	0.09	0.20	0.02	0.16
sacarosa	0.16	0.26	0.10	0.22
rafinosa	0.12	0.23	0.06	0.18
celobiosa	0.06	0.19	0.04	0.20
xilosa	0.02	0.19	0.04	0.20
etanol	0.06	0.20	0.04	0.20

<sup>1</sup> Los métodos de inculación y determinación del crecimiento de la biomasa se indica en Material y métodos. La variabilidad de los parámetros determinados no excedió en ningún caso de 0.01 h<sup>-1</sup>.

Sorprendentemente, encontramos que uno de los parámetros estudiados, la fase de latencia, presentaba grandes variaciones cuando las comparábamos con la cepa parental. Se han descrito distintas mutaciones que acarrear un aumento de la fase de latencia sin afectar al crecimiento exponencial equilibrado de los mutantes.

En general, puede deducirse que los mutantes presentan unas constantes de crecimiento levemente más bajas que la cepa parental, en cada una de las condiciones utilizadas. Se han descritos mutantes que presentan graves defectos en los estudios de las características de crecimiento sobre distintas fuentes de carbono. La razón de estos crecimientos defectuosos son tan abundantes como extensas las mutaciones descritas en estas cepas. Sin embargo, aunque las cepas de *Candida utilis* desreprimidas parecen que tienen desregulada gran parte de los sistemas de toma y consumo de distintas fuentes de carbono, estos errores en el control de represión no se trasladan en problemas serios respecto a la capacidad de crecimiento.



**Fig. 14.** Cinética de crecimiento de SDM-1 en medio K con glucosa tras un número distinto de preincubaciones sin la presencia de 2-DOG, determinado en incubador-lector de placas de micropocillos. Símbolos: (●) Curva de crecimiento de células no preinoculadas en medio K sin 2-DOG. (○) Muestras preinoculadas una vez sin el tóxico. (□) Muestras preinoculadas dos veces en medio sin 2-DOG.

Algunos autores han indicado que son mutaciones que afectan a los controles de transferencia de la llamada señal de glucosa (Thevelein, 1994). Por ejemplo, el mutante *byp1* (alélico a *CIF1*, *SST1*, *GLC6* y *TPS1*), comunicado por el grupo del Prof. Zimmermann (Breitenbach-Schmitt y col., 1984) en crecimientos sobre glucosa. Sin embargo, con las reservas que corresponden al utilizar una especie de levadura distinta a *Saccharomyces cerevisiae* y donde no ha sido posible hasta ahora trabajos en biología molecular, creemos que no es este nuestro caso. Hemos comprobado que la fase de latencia se puede reducir tras varios preinóculos sobre la fuente de carbono donde se efectúa el crecimiento. Creemos que es un efecto tóxico debido a la acumulación de 2-desoxiglucosa, presente en los medios de mantenimiento (Fig. 14 y Tabla XXII), como se puede comprobar con los resultados del apartado 3.5.3.2 y 3.6.2.

Los estudios más exhaustivos realizados con el mutante SDM-1 utilizando placas con micropocillos, con distintas técnicas donde la disponibilidad de oxígeno variaba, encontramos que, en general la  $\mu$  determinada era menor que la calculada para la cepa 3092. Además cuando utilizamos fuentes de carbono cuyo consumo es necesariamente oxidativo en *Candida utilis*, observamos un posible defecto aparentemente no relacionado con la deficiente capacidad de controlar la represión en el mutante SDM-1. Estos resultados nos hicieron sospechar que el mutante fuera defectuoso en la generación de poder reductor. Trabajos previos en *Candida utilis* no detectaron generación de poder reductor a través de la enzima mállica dependiente de NADP o de actividades transhidrogenasa (Bruinenberg y col., 1983a). En cultivos sobre fuentes glucolíticas no se ha detectado tampoco actividad acetaldehído deshidrogenasa dependiente de NADP, descartando la posibilidad de regeneración de NADPH por descarboxilación del piruvato en presencia de oxígeno (Bruinenberg y col., 1983a). Las únicas opciones para la regeneración del poder reductor son el ciclo de las pentosas y el ciclo de Krebs, en crecimientos donde la fuente

de nitrógeno es el amonio, como sucede en el medio K (Bruinenberg y col., 1983a; Bruinenberg y col., 1983b).

**Tabla XXII.** Cálculo de los parámetros de crecimiento en el mutante SDM-1. Estimación del efecto de la 2-desoxiglucosa<sup>1</sup>.

parámetro	nº de preinoculaciones en medio K sin 2-DOG		
	0	1	2 ó más
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.23	0.23	0.23
A (DO <sub>600</sub> final)	1.09	1.09	1.11
L (h)	17.8	15.9	4.1

<sup>1</sup> Valores calculados de acuerdo a la ecuación logística de crecimiento, expresada de esta manera:

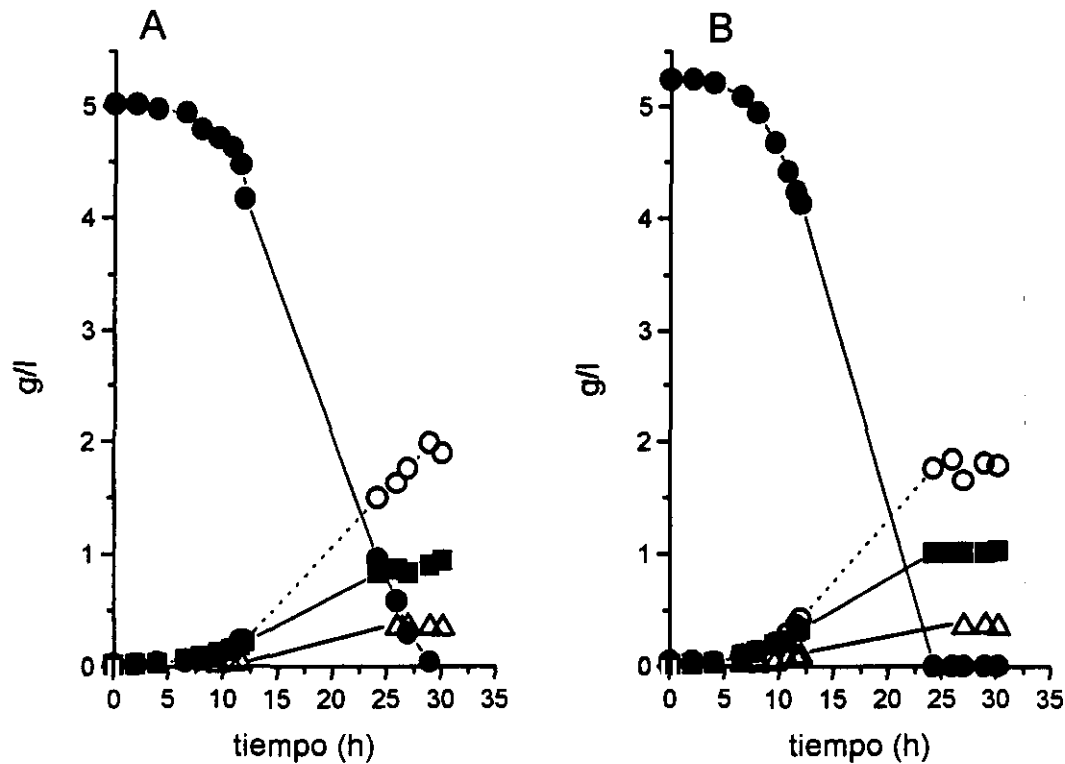
$$X = \frac{A}{1 + e^{\left(\frac{4\mu_{\max}}{A} (L - t) + 2\right)}} \quad (3.3)$$

Donde A se refiere al valor de la asíntota de la representación hiperbólica del crecimiento  $\ln X/X_0$  frente a t, asumida como biomasa final; L es la fase de latencia (Zwietering y col., 1990). Los incrementos de biomasa se determinaron por medidas de densidad óptica en un lector-incubador de placas de multipocillos.

Para resolver nuestra sospecha de que otro de los factores fisiológicos afectados en el mutante SDM-1 fuera la capacidad para generar poder reductor, hicimos unos cultivos en limitación de oxígeno en discontinuo (**Fig. 15**). La  $pO_2$  se determinó mediante una sonda polarográfica y se mantuvo durante el tiempo del experimento por debajo de 1%. No creemos que alcanzáramos la anaerobiosis estricta, pues ya se ha descrito que, con casi la única excepción de *Saccharomyces cerevisiae*, ninguna levadura es capaz de crecer en anaerobiosis estricta (Visser y col., 1990).

Comprobamos que las tasas de crecimiento y rendimiento en biomasa y etanol encontrados en el mutante fueron semejantes al control con la cepa parental. El  $Y_{\text{Etanol}}$  (1.5-1.3 mol etanol/mol glucosa) resultó tan alto o más que los consignados para *Saccharomyces cerevisiae*. Este resultado es similar al previamente publicado (Visser y col., 1990; Visser, 1995). El rendimiento final de biomasa se reduce considerablemente en ambas cepas, en comparación al encontrado en condiciones sin limitación de oxígeno (0.06-0.07 g/g). A su vez, la tasa de consumo de glucosa aumentaba espectacularmente respecto a los estudios en presencia de oxígeno. Los valores obtenidos se acercan a 19-18 mmol/(g·h), similares a las máximas tasas de consumo que se pueden encontrar en la bibliografía en experimentos de pulso en cultivo continuo (van Urk y col., 1988). Estos resultados validan las observaciones anteriores que adjudicaban a *Candida utilis* una respuesta positiva en el efecto Pasteur, definido como la inhibición del consumo de glucosa por la presencia de oxígeno (Gancedo y Serrano, 1989).

Cuando calculamos los balances de carbono para ambas cepas, determinamos unas



**Fig. 15.** Cultivos discontinuos de las cepas 3092 y SDM-1 en limitación de oxígeno con glucosa como fuente de carbono. Símbolos: (■) Biomasa en  $DO_{620}$ . (●) Glucosa en g/l. (○) Concentración de etanol (g/l). (Δ) Concentración de glicerol (g/l).

**Tabla XXIII.** Estequiometría del destino de la glucosa en cultivos en limitación de oxígeno.

cepa	destino de 1 mol de glucosa				
	biomasa (g)	etanol (mol)	glicerol (mol)	ác. acético (mol)	% destino determinado
3092	12.34	1.54	0.13	0	92.8
SDM-1	13.03	1.34	0.13	0.01	83.1

proporciones semejantes en los destinos de los átomos de carbono de la glucosa. Es de resaltar que no encontramos cantidades apreciables de ácido succínico (que puede ser determinado en fermentaciones de *Saccharomyces*) (Tabla XXIII).

Por otro lado, los datos ofrecidos con el análisis de las pruebas de crecimiento sobre distintos sustratos, realizado según los criterios de identificación sistemática (Barnett y col., 1990), arrojaron conclusiones con valor fisiológico (Tabla XXIV). La cepa SDM-1 y 3092 resultaron ser indistinguibles de acuerdo a los resultados de la identificación (la identidad como cepas *Candida utilis* se resolvió con una probabilidad  $p=1$ ). Esto significaba que no pudimos encontrar variaciones significativas respecto al consumo de una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno entre ambas cepas, en condiciones de fermentación (que se asumieron como en limitación de oxígeno) como en condiciones que posibilitaron la respiración de los sustratos. Tampoco detectamos fenómenos de auxotrofia, puesto que el mutante SDM-1 es capaz de crecer en medios sin vitaminas. Esto sugirió que no existía ningún defecto accesorio en el el mutante que residiera en la capacidad de metabolizar distintos sustratos que ya no hubiéramos descrito en los análisis preliminares.

Cuando nos preguntamos por el tipo de metabolismo con que las levaduras consumen los sustratos, realizamos pruebas de consumo de oxígeno y producción de  $\text{CO}_2$  mediante el método de Warburg (Tabla XXV).

**Tabla XXV.** Ensayos de intercambio de gases durante el consumo de distintas fuentes de carbono en la cepa parental y mutante SDM-1 por el método de Warburg directo.

cepa	glucosa			etanol		
	mmO <sub>2</sub> /gh	mmCO <sub>2</sub> /gh	C.R.	mmO <sub>2</sub> /gh	mmCO <sub>2</sub> /gh	C.R.
3092	10.5±0.5	11.5±0.4	1.09	5.92±0.2	1.67±0.6	0.28
SDM-1	10.6±0.6	11.4±0.5	1.07	5.06±0.3	1.08±0.5	0.35

<sup>1</sup> C.R. Calculado como la relación entre el  $\text{CO}_2$  total producido y el  $\text{O}_2$  consumido.

El mutante, al igual que la cepa parental, mantiene un metabolismo respiratorio durante el consumo de fuentes glucolíticas, determinado mediante la relación CR. Además este ensayo confirma que la velocidad con que se consumen estos sustratos es muy similar en ambas cepas. De todas maneras, la tasa de consumo de glucosa, calculada la sexta parte de la tasa de consumo de glucosa, resulta ser muy inferior a la calculada por nosotros. A pesar de todo, esta es claramente superior a la consignada por otros autores (Páca y Grégr, 1979; ). El CR determinado en los ensayos con etanol es muy inferior al teórico, puesto que la oxidación completa de cada mol del sustrato precisa el consumo de 3 moles de  $\text{O}_2$  y la producción de 2 moles de  $\text{CO}_2$  (CR 0.66). Este es un fenómeno frecuente. Ya se ha comunicado que es frecuente que *Candida utilis* no oxide completamente el etanol del medio, acumulándose metabolitos intermediarios como acético, indetectables mediante la técnica de Warburg (Páca y Grégr, 1979).

prueba	<i>Candida utilis</i>		
	3092	SDM-1	tipo
fermentación de			
D-glucosa	+	+	+
D-galactosa	-	-	-
maltosa	-	-	-
Metil- $\alpha$ -glucosido	-	-	-
sacarosa	+	+	+
$\alpha,\alpha$ -trehalosa	-	-	-
melibiosa	-	-	-
lactosa	-	-	-
celobiosa	-	-	-
melezitosa	-	-	-
rafinosa	+	+	+, -
asimilación de			
D-glucosa	+	+	?
D-galactosa	-	-	-
L-sorbose	-	-	-
D-ribosa	-	-	-
glucosamina	-	-	-
D-xilosa	+	+	+
D-arabinosa	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-
D-ramnosa	-	-	-
sacarosa	+	+	+
maltosa	+	+	+
$\alpha,\alpha$ -trehalosa	+	+	+
metil $\alpha$ -D-glucosido	+	+	-, R
celobiosa	+	+	+
salicina	+	+	+
arbutina	+	+	+
melibiosa	-	-	-
lactosa	-	-	-
rafinosa	+	+	+
melezitosa	+	+	+
inulina	+	+	-, R
almidón	-	-	-
glicerol	+	+	+
eritritol	-	-	-
ribitol	-	-	-
xilitol	-	-	-, R
D-glucitol	-	-	+, -

D-manitol	-	-	+, R
galactitol	-	-	-
mio-inositol	-	-	-
D-glucosa-1,5-lactona	+	+	+
D-gluconato	+	+	+, R
D-glucuronato	-	-	-
D-galacturonato	-	-	-
DL-lactato	+	+	+
succinato	+	+	+
citrato	+	+	+
metanol	-	-	-
etanol	+	+	+
fuentes de nitrógeno			
nitrato	+	+	+
nitrito	+	+	+
etilamina	+	+	+
L-lisina	+	+	+
cadaverina	+	+	+
creatina	-	-	-
creatinina	-	-	-
glucosamina	N.D.	N.D.	-
imidazol	N.D.	N.D.	-
otros			
c/s vitaminas	+	+	+
crecimiento a 25°C	+	+	+
crecimiento a 30°C	+	+	+
crecimiento a 35°C	+	+	+
crecimiento a 37°C	+	+	+
crecimiento a 40°C	+	+	+, -
resist. cicloheximida 0.01%	-	-	-
resist. cicloheximida 0.1%	-	-	-
crecimiento en glucosa 50%	-	-	+, -
crecimiento en glucosa 60%	-	-	-

**Tabla XXIV.** Pruebas para la identificación sistemática de las cepas de *Candida utilis* IGC 3092 y SDM-1.

cepas tipo: CBS 567, 621, 839, 840, 841, 842, 890, 1517, 1600, 4511, 4885, 4886 y 5609.



**3.5.3.2. Cultivos en fermentador.** Realizamos una serie de crecimientos en fermentador con una variedad de fuentes de carbono y utilizando el medio YPD y K. Los resultados se muestran en las **Tabla XXVI** y **Fig. 16**.

Al igual que ha sido comentado en el apartado anterior, las constantes de tasa de crecimiento son levemente menores que los controles con la cepa parental. Es de destacar que con esta técnica, se evitaba la fase de latencia desmesurada detectada en cultivos en matraz. Este dato contribuye a apoyar el dato anterior de un efecto tóxico por la 2-desoxiglucosa, que puede ser eliminado cuando los parámetros físicos de cultivo están controlados (especialmente la cantidad de oxígeno disuelto).

**3.5.3.3. Desrepresión en mezclas maltosa-glucosa.** Los análisis de las actividades enzimáticas estudiadas anteriormente, apuntaban a la capacidad teórica para consumir simultáneamente otras fuentes de carbono además de la glucosa por parte de los mutantes.

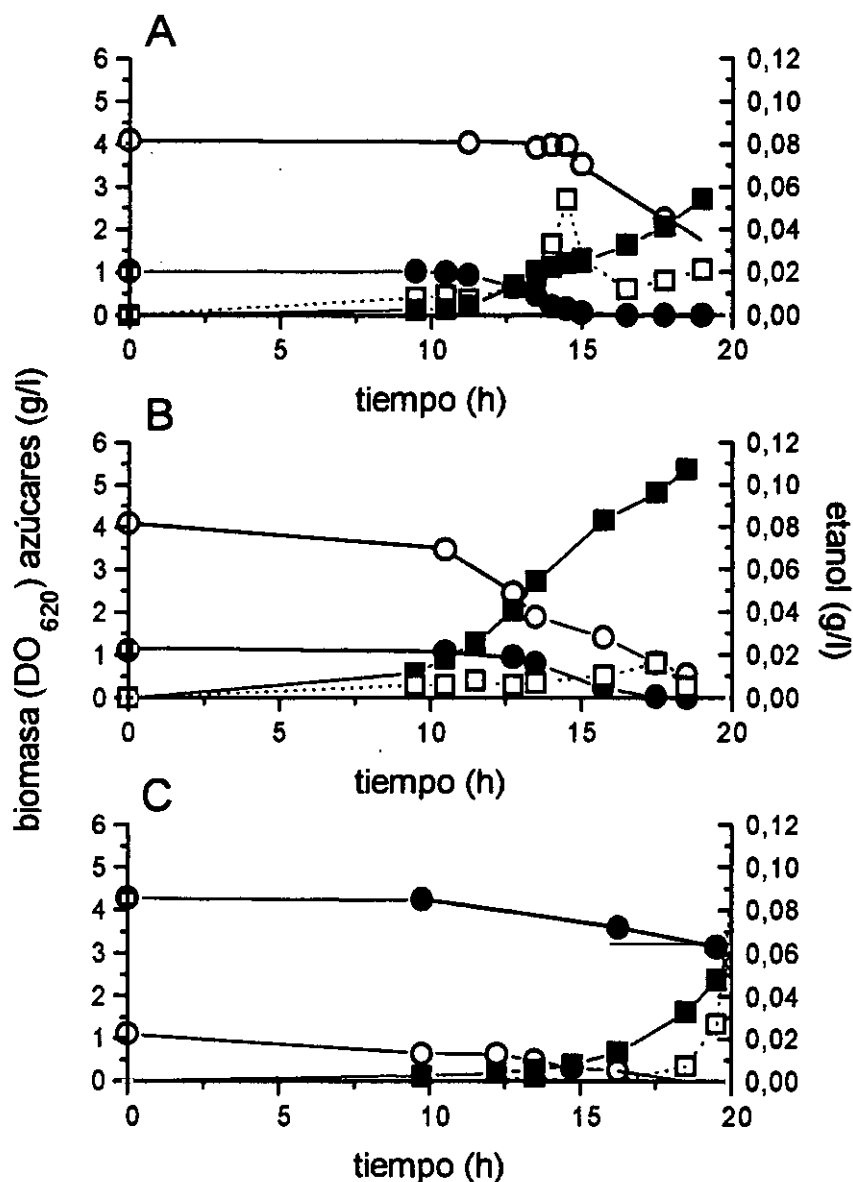
**3.5.3.3.1. Cultivos discontinuos en matraz.** Realizamos cultivos en discontinuo con los 3 mutantes obtenidos para el examen de la existencia de una desrepresión real de los mutantes en mezclas de fuentes de carbono. Para que la maltosa pueda ser metabolizada conjuntamente con la glucosa es necesario no sólo altos niveles de  $\alpha$ -glucosidasa, sino también una suficiente actividad transportadora de la maltosa. El transporte de maltosa en *Candida utilis* está sujeto a una fuerte regulación: es inducible por maltosa y reprimible e inactivable por glucosa (Peinado y col., 1987a). De esta manera, si el paso del transporte estuviera seriamente disminuido por la presencia de glucosa, no se observaría un crecimiento sustentado sobre glucosa y maltosa cuando los mutantes fueran crecidos en ambas fuentes de carbono.

Hemos de destacar que las cepas SDM-2 y SDM-9 mostraron durante el primer año de ensayo resultados variables respecto a la capacidad para consumir simultáneamente dos fuentes de carbono. Finalmente, perdieron los caracteres de desrepresión con que fueron aislados. Por ello, todos los análisis contenidos en este capítulo y en los siguientes se refieren únicamente a la cepa SDM-1.

Se han descrito los umbrales mínimos de glucosa que impiden el consumo simultáneo de ambos azúcares en la cepa parental de *Candida utilis* (Peinado y col., 1987a; Peinado y col., 1987b). Este se sitúa en torno a 0.01% (p/v). Tomando en cuenta este dato, examinamos el crecimiento de los mutantes en mezclas donde la concentración inicial de glucosa fuera 10 veces y 40 veces superiores al umbral de inhibición del consumo de maltosa (0.1% y 0.4% (p/v), respectivamente). La concentración total de fuente de carbono se situó en 0.5% (p/v). Los datos obtenidos se enfrentaron con el control de la cepa parental 3092 (**Fig. 17**).

Los datos de los cultivos de la cepa parental se corresponden a lo previsto: las primeras fases de cultivo se sustentaban sobre la glucosa. Durante este crecimiento y debido a las condiciones experimentales, se producían cantidades significativas de etanol. Una vez que la concentración de glucosa caía por debajo de la mínima que impide el crecimiento sobre maltosa, era posible el crecimiento sobre el disacárido.

Es significativo los sucesos ocurridos durante la transición entre el consumo de glucosa y el crecimiento sobre maltosa. La concentración de etanol libre en el medio de cultivo descendió hasta ser menor que 1 mM. Posteriormente, la concentración de etanol se mantuvo baja en el medio de cultivo durante el crecimiento en maltosa. Nuestra

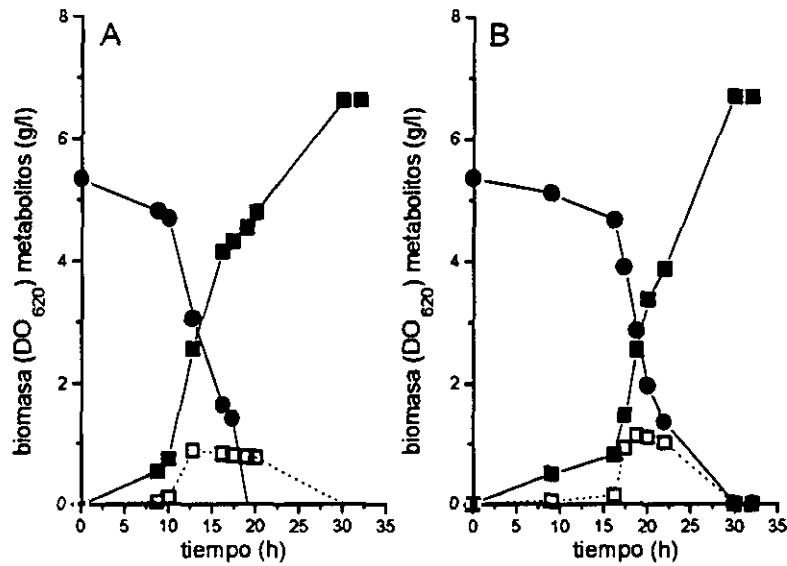


**Fig. 17.** Cultivos discontinuos con mezclas de azúcares. Demostración de la desrepresión de SDM-1 *in vivo*. **A** Muestra de crecimiento de la cepa parental en un medio con glucosa (0.1)-maltosa (0.4). **B** Muestra de un crecimiento de la cepa SDM-1 en un medio glucosa (0.1)-maltosa (0.4). **C** SDM-1 en un medio con glucosa (0.4)-maltosa (0.1). Todas las concentraciones de azúcares dadas en % (p/v). Símbolos: (■) Biomasa. (●) Glucosa. (○) Maltosa. (□) En una línea punteada etanol producido.

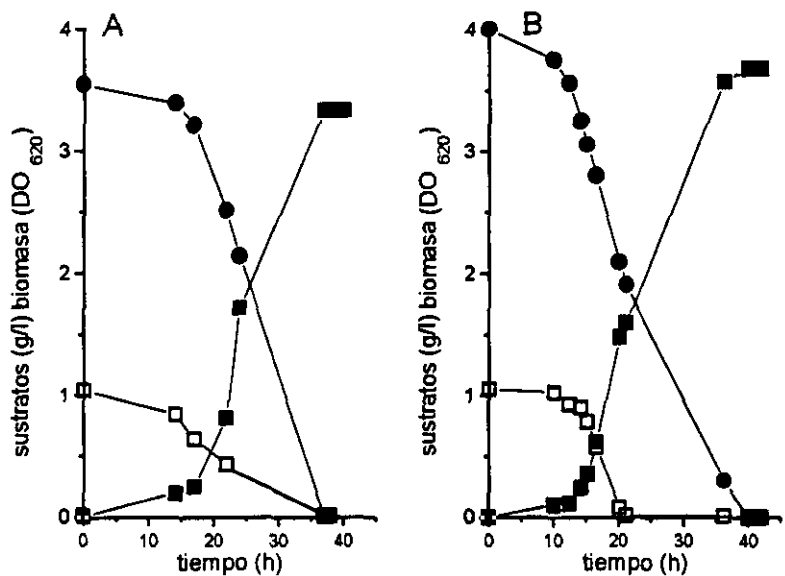
levadura presenta el llamado efecto Kluyver en la utilización de maltosa: es incapaz de asimilar la maltosa por metabolismo fermentativo (Kluyver y Custer, 1940). No es un efecto específico para este azúcar puesto que también resulta ser Kluyver positiva con la trehalosa, la celobiosa y la melezitosa, según los criterios utilizados en la clasificación sistemática de la levadura (Barnett y col., 1990; ver **Tabla XXIV**). Las razones de este efecto han sido buscadas durante mucho tiempo. Nuestra levadura posee la maquinaria enzimática suficiente para el consumo fermentativo de la maltosa, aunque parece que la capacidad para transportar el disacárido está impedida en limitación de oxígeno. Se creyó que el efecto era debido a una acción directa del oxígeno sobre los transportadores (Barnett y Sims, 1982; Sims y col., 1984; Schulz y Höfer, 1986; Höfer y Nassar, 1987). Otras explicaciones indicaban que el efecto se debía, también, a una regulación de la piruvato descarboxilasa (Sims y Barnett, 1991; Sims y col., 1991; Barnett, 1992). Sin embargo, recientemente se ha descrito que *Candida utilis* es incapaz de asimilar maltosa en presencia de cantidades superiores a 1 mM de etanol, incluso en presencia de oxígeno, sean estas producidas por la actividad metabólica o suministradas al medio exógenamente. Así se especularía que el etanol tuviera un papel en la regulación del consumo de maltosa fermentativo similar a una retroinhibición por producto (Weusthuis y col., 1994a; Weusthuis y col., 1994c). No se ha determinado la razón bioquímica o molecular subyacente, aunque no parece ser éste el mecanismo que genera el efecto Kluyver en todas las levaduras (Kaliterna y col., 1995).

Los datos obtenidos en el intervalo de tiempo entre el consumo de glucosa y el crecimiento sobre maltosa se ajustan al modelo del efecto directo del etanol sobre el consumo de maltosa.

La célula parece regular la capacidad de producir etanol durante el crecimiento sobre maltosa, aunque, como se determinó durante la fase de crecimiento sobre glucosa, la cantidad de oxígeno disuelto no debió ser suficiente para un metabolismo completamente oxidativo sobre el azúcar, según las evidencias experimentales procedentes del consumo de glucosa. El hecho es que la tasa de producción de etanol resultó ser mayor en la última fase del crecimiento en glucosa que en los primeros instantes del crecimiento, lo que indicaba que la participación del metabolismo fermentativo aumentaba cuando la densidad de la población era suficientemente grande, ajustándose a la predicción de la producción de etanol en levaduras Crabtree negativa como *Candida utilis* en condiciones de carencia de oxígeno (van Dijken y Scheffers, 1986; Castrillo y Ugalde, 1993). Pudimos observar, a su vez, que, aunque *Candida utilis* es una levadura nétamente oxidativa, una pequeña proporción de su metabolismo se deriva a la producción de etanol (ver **Fig. 18**), de acuerdo a la clasificación de Gancedo y Serrano (1989). Por lo tanto, la cantidad de etanol producido dependerá de la velocidad con que los sustratos sean consumidos. En la segunda fase de crecimiento, realizada sobre maltosa, esta consideración adquiere consistencia, pues pudimos hallar una reducida tasa de consumo del disacárido (en estas condiciones, la maltosa desaparece en torno a 1.32 mmol maltosa/(g·h), mientras que la glucosa era consumida con una tasa de 4.89 mmol glucosa/(g·h)). La tasa de consumo de maltosa calculada en esta segunda fase de crecimiento, resulta ser más pequeña que la que determinamos previamente en la fase exponencial de crecimientos sobre maltosa como única fuente de carbono (1.79 mmol maltosa/(g·h)). En la razón por la cual este consumo es lento, probablemente intervienen los factores ambientales restrictivos para el crecimiento



**Fig. 18.** Curvas de crecimiento con glucosa y representación del etanol producido, asociado al crecimiento. **A** Cepa parental. **B** Cepa SDM-1. Símbolos: (■) Biomasa. (●) Glucosa. (□) Etanol. En línea punteada, etanol producido.



**Fig. 19.** Consumo simultáneo de glucosa y etanol como característica de la especie *Candida utilis*. **A** Representación de la cepa parental. **B** Representación de la cepa SDM-1. Símbolos: (●) Biomasa. (●) Glucosa. (□) Etanol. Las concentraciones iniciales fueron de glucosa 0.4% (p/v) y etanol 0.1% (p/v).

que son habituales en los últimos estados del crecimiento en discontinuo (bajo pH, escaso oxígeno disuelto, etc.).

Los resultados con la cepa SDM-1 fueron repetitivos en las dos condiciones de ensayo. Esta cepa fue capaz de asimilar ambos azúcares que contenía el medio de cultivo de forma simultánea, incluso cuando la concentración de glucosa excedía 40 veces la mínima que imposibilitaba el consumo de maltosa en la cepa parental (Fig. 17B y Fig. 17C).

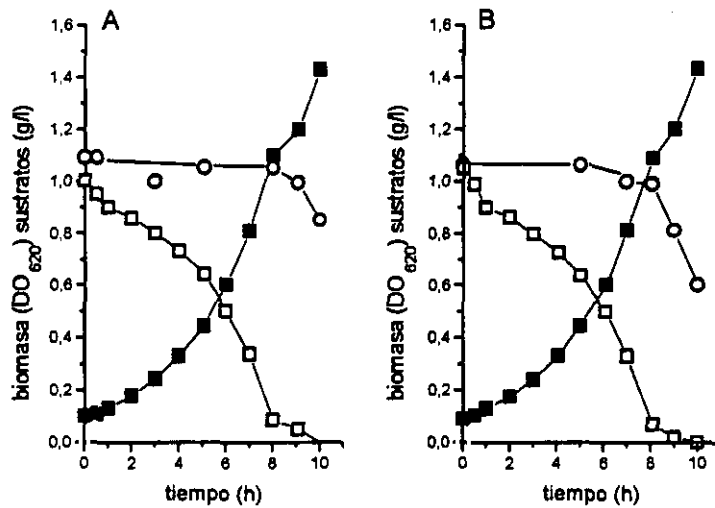
Cuando analizamos la evolución de la producción de etanol asociada al crecimiento en el mutante SDM-1 encontramos fenómenos que lo distinguía de la cepa parental. Aunque de acuerdo a las hipótesis recientes que relacionan la imposibilidad de consumir maltosa en presencia de cantidades significativas de etanol, en la cepa SDM-1 la concentración de este producto de deshecho permanecía muy baja mientras existía maltosa en el medio. Solo en el caso de que tras el consumo de maltosa existiera glucosa residual que permitiera un crecimiento posterior de la levadura, se pudo observar un aumento de la tasa específica de la producción de etanol.

Cuando comparamos las tasas de producción de etanol en la cepa parental y en el mutante, descubrimos que a las concentraciones de biomasa que implicaban el disparo de la producción de etanol en la cepa parental, la cantidad de etanol encontrada en cultivos con mutantes eran semejantes a las del un consumo netamente oxidativo. Esto sucedía a pesar de que la tasa de consumo de las fuentes de carbono eran semejantes para las dos cepas (... y ... mmol equivalentes de glucosa/(g·h), respectivamente -utilizamos esta unidad, pues la levadura sostiene el crecimiento sobre glucosa y maltosa, de la cual obtiene el monómero-). Aparentemente, el mutante era capaz de regular la producción de etanol debajo de 1 mM cuando las cantidades de maltosa residual en el medio resultaban medibles. Se podría inferir que el metabolismo de maltosa y glucosa permanece oxidativo en la cepa SDM-1 aunque las densidades de población en los matraces fueran lo suficientemente altas como para que la participación del metabolismo fermentativo a partir del consumo de glucosa fuera apreciable (Fig. 18B). Incluso en experimentos con glucosa como única fuente de carbono en el mutante, se pudo observar un incremento de la producción específica de etanol cuando la biomasa alcanzó una concentración suficiente (Fig. 18B), a pesar de que de acuerdo a la capacidad de consumir glucosa y etanol simultáneamente en *Candida utilis*, el producto de fermentación empieza a ser metabolizado antes de que la glucosa sea completamente consumida. En ninguno de los experimentos pudimos detectar cantidades medibles de otros productos de fermentación.

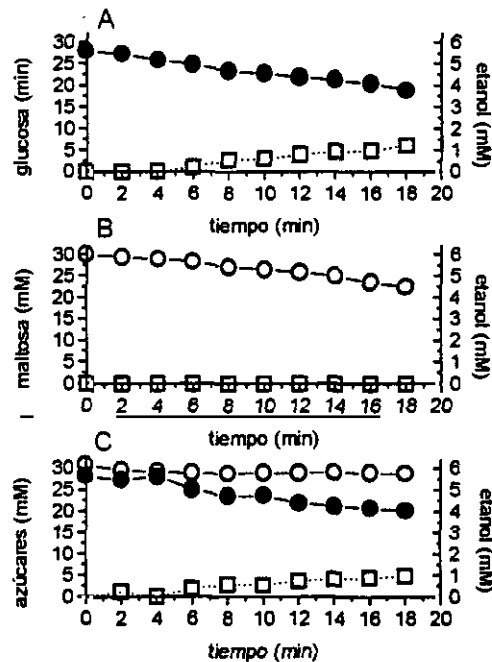
Los datos obtenidos en el mutante sugerían que esta cepa era capaz de adecuar el metabolismo de glucosa de tal manera que permitiera el consumo de maltosa, limitando la producción de etanol. Cuando nos preguntamos si la regulación del efecto Kluyver en la cepa mutante pudiera ser distinta a la de la cepa parental, realizamos los siguientes experimentos:

- Confirmamos que *Candida utilis* es capaz de asimilar simultáneamente glucosa y etanol. De esta manera, tal como comunicaron Vraná y col. (1989) y Weusthuis y col. (1994a), la presencia de etanol no impide el consumo de fuentes glucolíticas al darse la presencia de la maquinaria enzimática glucolítica suficiente para asimilar glucosa (Fig. 19).

- Cuando estudiamos el efecto inhibitorio del etanol sobre el consumo de maltosa



**Fig. 20.** Consumo preferencial de etanol en mezcla etanol-maltosa. Crecimientos realizados en fermentador con saturación de oxígeno. **A** Cepa parental. **B** Cepa SDM-1. Símbolos: (■) Biomasa. (○) Maltosa. (□) Etanol. Concentraciones iniciales de sustrato: 0.1% (p/v).



**Fig. 21.** Efecto tóxico del etanol de fermentación en el consumo de maltosa por células desenergizadas procedentes de cultivos con glucosa. **A** Consumo de glucosa. **B** Consumo de maltosa. **C** Consumo de mezcla maltosa-glucosa. Símbolos: (●) Glucosa. (○) Maltosa. (□) Etanol. La concentración de células fue de 3% (peso húmedo/v). La cepa 3092 no asimila maltosa en ensayos similares al mostrado en la fig. B.

en el mutante, observamos que también en nuestras levaduras, parental y mutante, no se producía el consumo de maltosa hasta que la concentración de etanol era menor de 1 mM (Fig. 20). De esta manera concluimos que la diana donde el etanol imposibilitara el consumo de maltosa en *Candida utilis* debía situarse en algún punto del metabolismo específico de la maltosa.

► Se obtuvieron células desenergizadas de SDM-1 procedentes de la fase exponencial de medios con glucosa. Se observó que eran capaces de consumir glucosa y maltosa independientemente, cuando la concentración inicial era de 30 mM, durante cortos intervalos de tiempo. Sin embargo, no se determinó la capacidad de consumir glucosa y maltosa en un tampón con una mezcla de azúcares. Se observó que la maltosa no era consumida puesto que las concentraciones de etanol en el tampón rápidamente superaron el umbral de concentración de 1 mM (Fig. 21). Con este abordaje experimental, eliminamos la posibilidad de una incapacidad de las células desenergizadas para consumir maltosa por alguno de los mecanismos desencadenados por la glucosa conocidos, bien inactivación del transporte, bien represión del transporte o de la hidrolasa. La inactivación de los transportadores requiere al menos 30 min para eliminar el 50% de la actividad original (Peinado y col., 1987a) y no es esperable la desaparición de la  $\alpha$ -glucosidasa preexistente en estas células sin capacidad de crecimiento, al menos en el tiempo de experimentación.

► Tampoco se observó un consumo de ambas fuentes de carbono en experimentos con el mutante SDM-1, donde la cantidad de oxígeno disuelto estaba limitada por la agitación en la cubeta del fermentador (Fig. 22), tras la acumulación de etanol tal como esperaba el modelo desarrollado por el grupo de Delft (Weusthuis y col., 1994a; Weusthuis y col., 1994c).

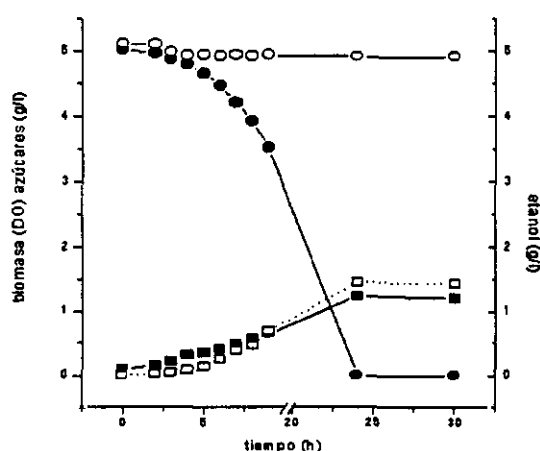


Fig. 22. Cinéticas de consumo de glucosa y maltosa en fermentador. Efecto de la producción de etanol por la toma de glucosa. Las condiciones fueron de limitación de oxígeno (flujo de aireación 0.1 vvm, agitación 100 rpm). Símbolos: (■) Biomasa. (●) Glucosa (g/l). (○) Maltosa (g/l). (□) etanol

Aunque no hallamos podido saber cómo, existe un mecanismo en las células que se encuentran creciendo en un medio completo, cuando la cantidad de oxígeno inicial es suficiente para un consumo respiro-fermentativo, que modula el metabolismo de glucosa en cultivos con mezclas de glucosa-maltosa, de tal manera, que hace posible el consumo del disacárido por la cepa desreprimida por acumulación de etanol.

Cuando analizamos las constantes cinéticas y energéticas del crecimiento determinadas con los experimentos de consumo simultáneo de glucosa y maltosa descubrimos que el consumo simultáneo sobre dos fuentes de carbono no implicaba necesariamente una mejora respecto a las constantes conseguidas cuando el crecimiento se efectuaba sobre una única fuente de carbono (Tabla XXVII).

**Tabla XXVII.** Parámetros del crecimiento en discontinuo en medio K con distintas fuentes de carbono. Comparación entre los valores de la cepa 3092 y la cepa SDM-1.

	glucosa 0.5%	maltosa 0.5%	glucosa 0.1% maltosa 0.4% <sup>1</sup>	glucosa 0.4% maltosa 0.4% <sup>1</sup>
<b>3092</b>				
$\mu$	0.41±0.03	0.29±0.01	0.43±0.02 (0.21±0.02)	0.39±0.04 (0.20±0.01)
Y (g/g)	84.74±2.3	163.2±3.50	87.93±1.7 (161.7±2.7)	79.4±2.6 (150±1.9)
q (mmol/(g·h))	4.89±0.52	1.78±0.03	4.89±0.01 (1.32±0.15)	4.91±0.02 (1.33±0.04)
<b>SDM-1</b>				
$\mu$	0.38±0.01	0.27±0.03	0.35±0.01	0.39±0.01
Y (g/g)	85.95±3.8	172.0±10.2	?	?
q (mmol/(g·h))	4.43±0.24	1.60±0.22	? <sup>2</sup>	? <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Los datos de la cepa 3092 entre paréntesis indican los valores observados en la segunda fase de crecimiento sobre maltosa. Los que se calcularon en la primera fase del crecimiento sobre glucosa aparecen sin ser incluidos entre paréntesis. <sup>2</sup> Los valores se calcularon como equivalentes de hexosas, puesto que el crecimiento se efectuó simultáneamente sobre glucosa y maltosa.

En general, el mutante crecía consumiendo las fuentes de carbono a menor velocidad que el parental cuando el sustrato que sustentaba el crecimiento era único. El consumo simultáneo de maltosa y glucosa no mejoraba el rendimiento final en biomasa, cuando se comparó este valor con el conseguido en la cepa parental, independientemente de la proporción inicial entre los dos azúcares. Sin embargo, la biomasa final podía ser obtenida más rápidamente en el mutante que en la cepa parental. La razones de este



fenómeno pueden residir en:

► La cepa parental compartimentaliza su crecimiento sobre los azúcares en el tiempo. Entre el consumo de glucosa y el de maltosa, se puede determinar una breve fase de ralentización del crecimiento, mientras que el mutante carece de esta fase. Este período de adaptación de la cepa parental empleado para iniciar el consumo de maltosa, significa un retardo en el tiempo necesario para que las fuentes de carbono desaparezcan del matraz.

► La última fase del crecimiento en la cepa parental se realizó en maltosa. Ya hemos comentado que los factores ambientales pueden afectar la tasa de consumo y de crecimiento en las fases tardías del crecimiento. En nuestra especie de levadura se requiere, para que el consumo de maltosa sea óptimo, una cantidad de oxígeno disuelto elevada, que creemos no se puede garantizar en esta fase.

Al analizar la tasa de consumo de ambos azúcares por la cepa mutante, comprobamos que tanto la maltosa como la glucosa eran consumidas sin ninguna preferencia, siempre que la concentración residual de maltosa fuera suficientemente grande como para que las células fueran capaces de consumirla a gran velocidad (Fig. 23).

Existen modelos que son capaces de explicar el consumo de una mezcla de fuentes de carbono. Sin embargo, la mayor parte de ellos requieren un abordaje matemático extremadamente complicado, a veces utilizan abordajes con escasa significación biológica

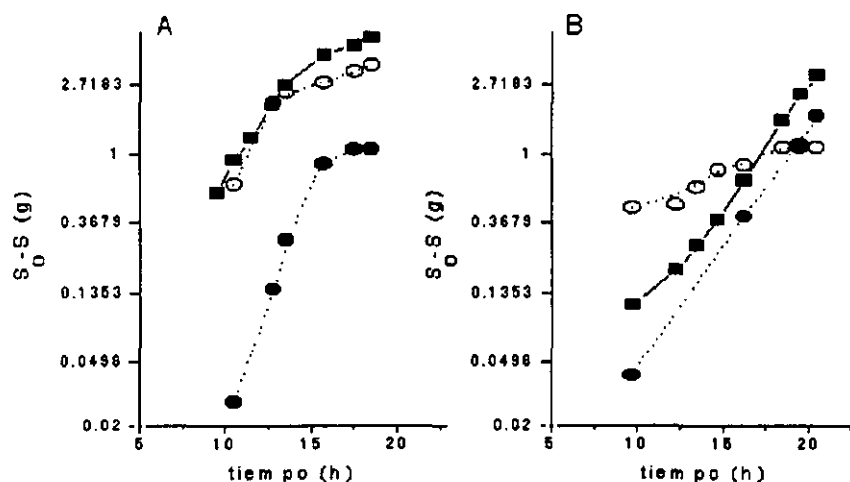


Fig. 23. Representación en escala semilogarítmica del consumo de la mezcla de azúcares, a partir de los resultados de las fig. 17B y 17C. A Interpretación de los resultados de la fig. 17B. B Interpretación de los resultados de la fig. 17C. Símbolos como en la Fig. 17.

y no siempre explican adecuadamente las cinéticas observadas (como revisión, ver Nielsen y Villadsen, 1992). Con el fin de estudiar el comportamiento cinético del consumo de ambos sustratos, elaboramos el siguiente abordaje:

La levadura sostenía el crecimiento a partir del consumo de ambos azúcares. De esta manera, la tasa de crecimiento  $\mu$ , se puede explicar de esta manera:

$$\mu_{mixto} = \mu_G + \mu_M \quad (3.4)$$

Donde  $\mu_G$  es la tasa de crecimiento fraccional sustentada por la glucosa del medio con la mezcla de azúcares. Al determinar que la  $\mu_{mixto}$  era semejante al valor de  $\mu_G$  (es decir, la  $\mu$  de crecimientos con glucosa como única fuente de carbono), resulta evidente que en un consumo simultáneo de fuentes de carbono,  $\mu_G < \mu_G$ .

El modelo de Monod puede relacionar la tasa de crecimiento con el sustrato residual y velocidad de consumo de sustrato, según la expresión:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3.5)$$

Donde  $K_s$  es la afinidad por el sustrato y la  $\mu_{max}$  es la tasa de consumo que se puede observar cuando la tasa de consumo de sustrato es la máxima posible ( $q_{max}$ ). La expresión resulta útil para identificar el motivo del hecho experimental que ocasiona que  $\mu_G < \mu_G$ ; y simultáneamente que  $\mu_M \neq 0$  y  $< \mu_M$ . Los parámetros que no son fijos en la ecuación 3.5 son  $K_s$  y  $q_{max}$ . Por lo tanto, parece razonable que en la afinidad y/o en la tasa a la que se consume el sustrato pudiera residir la explicación del fenómeno.

Con el propósito de modelizar el crecimiento en las mezclas glucosa-maltosa hemos desarrollado una expresión de esta manera. El crecimiento exponencial se ajusta a esta expresión:

$$\mu = q_G \cdot Y_G + q_M \cdot Y_M \quad (3.6)$$

Donde  $q_G$  y  $q_M$  resultan ser las tasas de consumo de cada uno de los azúcares, glucosa y maltosa, respectivamente. Los rendimientos que obtuvimos en los crecimientos sobre cada una de las fuentes de carbono por separado, arrojaron valores semejantes. De esta forma, podemos asumir que  $Y_G$  y  $Y_M$  son iguales. Así la ecuación se simplifica a la expresión:

$$\frac{\mu}{Y} = q_G + q_M \quad (3.7)$$

La tasa de consumo de cada uno de los azúcares se asume que puede modelizarse en forma de una cinética de saturación en función del sustrato adicionado al medio. Así para el caso del consumo de glucosa:

$$q_G = \frac{q_{Gmax} \cdot G}{K_{s_G} + G} \quad (3.8)$$

De la misma forma, el consumo de maltosa, se asume como una cinética según el modelo de Monod:

$$q_M = \frac{q_{Mmax} \cdot G}{K_{s_M} + M} \quad (3.9)$$

A su vez, el rendimiento  $Y$  se describe como:

$$(3.10) \quad Y = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)}$$

Podemos despejar la tasas de consumo de sustrato, por tanto, como:

$$\frac{q_{Gmax} \cdot G}{Ks_G + G} + \frac{q_{Mmax} \cdot M}{Ks_M + M} = \frac{\mu}{\frac{(X - X_0)}{(S_{T0} - S_T)}} \quad (3.11)$$

Donde  $S_{T0}$  es la cantidad de azúcar total inicial en el experimento y  $S_T$ , la concentración de azúcar total residual, como suma de la cantidad de glucosa (G) y de maltosa (M). Y el crecimiento de la biomasa se ajusta a la ecuación:

$$X = X_0 + \frac{\mu(S_{T0} - S_T)}{\frac{q_{Gmax} \cdot G}{Ks_G + G} + \frac{q_{Mmax} \cdot M}{Ks_M + M}} \quad (3.12)$$

Así podemos relacionar el crecimiento de la biomasa con las afinidades para el consumo de ambas fuentes de carbono y de las tasas máximas de consumo.

► **La afinidad por el sustrato es distinta en cultivos con mezclas de fuentes de carbono y en cultivos con una única fuente de carbono.** Con el fin de estudiar la afinidad del mutante en cultivos con mezclas de sustratos podemos despejar el valor de afinidad para el consumo de glucosa ( $Ks_G$ ) y de afinidad para el consumo de maltosa ( $Ks_M$ ), en función de los valores de consumo  $q_{Gmax}$  y  $q_{Mmax}$ . Se puede fijar los valores de  $q_{Gmax}$  y  $q_{Mmax}$  teóricos, si se asume que son semejantes a los deducidos en los crecimientos con maltosa o glucosa como fuentes únicas de carbono. Esta aproximación es posible si se considera que la capacidad máxima para consumir una fuente de carbono es un parámetro específico de cepa y de las condiciones físicas en las que el microorganismo es crecido, con independencia de la presencia de otras fuentes de carbono alternativas. Los valores de  $\mu$  introducidos en el ajuste son las tasas de crecimiento instantáneo para cada una de las fases de cultivo (Tabla XXVIII).

**Tabla XXVIII.** Afinidades para el consumo de distintos sustratos calculadas en cultivos discontinuos en la cepa SDM-1<sup>1</sup>.

glucosa 0.5%	maltosa 0.5%	glucosa 0.1%- maltosa 0.4%		glucosa 0.4%- maltosa 0.1%	
Ks	Ks	Ks <sub>G</sub>	Ks <sub>M</sub>	Ks <sub>G</sub>	Ks <sub>M</sub>
1.68±0.33	13.2±1.8	3.80±0.88	15.2±2.43	2.83±0.85	13.9±1.97

<sup>1</sup> Valores de Ks dados en mM. Se asume que los valores de  $q_{max}$  para cada uno de los azúcares es semejante a la calculada en cultivos con fuentes de carbono puras.

Al determinar las Ks, se obtuvieron resultados sorprendentes. La Ks de la maltosa

resultó estar en el rango de concentración de maltosa similar a la calculada en cultivos con maltosa pura. Esto puede explicar las pendientes de consumo de maltosa mostradas en las Fig. 23. Sólo cuando la cantidad de maltosa residual alta, la cinética de consumo del disacárido es paralela a la formación de biomasa. Sin embargo, cuando la concentración de maltosa en el matraz fue menor de 1 g/l, la levadura era incapaz de mantener la tasa de consumo que mostraba en las fases iniciales del crecimiento.

Sin embargo, la  $K_s$  de la glucosa resultó superior a la calculada en cultivos puros de glucosa en matraz. Así con la hipótesis que considera invariables las tasas máximas de consumo de un azúcar, se obtiene que la afinidad modulable es la de la glucosa.

► La  $q_{\max}$  para un azúcar determinado es dependiente de la existencia de otras fuentes de carbono en el medio. En este caso, la afinidad por cada una de los azúcares sería constante. Esta hipótesis asumiría que el metabolismo de una fuente de carbono alternativa perturbará la capacidad del microorganismo para consumir una fuente de carbono.

Los valores obtenidos se presentan en la siguiente **Tabla XXIX**.

**Tabla XXIX.** Tasas de consumo de distintos sustratos calculadas en cultivos discontinuos en la cepa SDM-1<sup>1</sup>.

glucosa 0.5%	maltosa 0.5%	glucosa 0.1%- maltosa 0.4%		glucosa 0.4%- maltosa 0.1%	
q <sub>max</sub>	q <sub>max</sub>	q <sub>maxG</sub>	q <sub>maxM</sub>	q <sub>maxG</sub>	q <sub>maxM</sub>
4.89±0.52	1.78±0.03	1.33±0.09	1.67±0.15	4.42±0.30	1.31±0.15

<sup>1</sup> Valores dados en mmol sustrato/(g·h). Se asume que los valores de  $K_s$  en los crecimientos con mezclas de fuentes de carbono son semejantes a las obtenidas en cultivos con azúcares puros.

De nuevo, podemos modelizar un comportamiento de la levadura donde el consumo de maltosa no estaría afectado seriamente por la presencia de distintas cantidades de glucosa. Sin embargo, la capacidad para consumir glucosa sí dependería de la concentración externa del azúcar en el medio.

► Tanto la afinidad por los sustratos, como la velocidad a la que estos se consumen se efectan en cultivos con mezclas de fuentes de carbono. En este caso, el ajuste matemático impone la estimación de cuatro parámetros. Los resultados obtenidos por los métodos de regresión no lineal, no fueron aceptables. Se pueden calcular distintas soluciones a cada uno de los parámetros a estimar con semejante correlación. Sin embargo, la mayor parte de estas soluciones no tienen un significado fisiológico. Así no pudimos determinar si existen alteraciones simultáneamente en la afinidad y la constante de consumo máximo de los azúcares.

De esta manera, podemos explicar el consumo de dos fuentes de carbono con dos

abordajes cuyas soluciones tienen implicaciones fisiológicas, que tratamos a continuación. Para ello es preciso considerar la secuencia del circuito del consumo de azúcares, donde el sustrato primero es transportado y luego metabolizado, podemos encontrar la causa más probable que ocasionara que la afinidad por glucosa dependiera de la presencia de otras fuentes de carbono.

Así la variabilidad de la  $K_{S_G}$  tendría sustanciación a partir de algunos resultados obtenidos de estudios con *Saccharomyces cerevisiae* crecida en discontinuo, donde se comprobó que la capacidad total para transportar glucosa, al examinar tanto la  $V_{max}$  como la  $K_m$  aparentes, podría estar condicionada por factores ambientales o concentración de nutrientes (Serrano y De la Fuente, 1974; Walsh y col., 1994a; Gonçalves y Loureiro-Dias, 1994). Otro estudio indicaba la aparente regulación del transporte de alta afinidad de *Saccharomyces cerevisiae* cuando la cepas cervceras y de laboratorio de esta levadura eran crecidas en la presencia de distintas cantidades de maltosa (Ernandes y col., 1992). Diferentes trabajos concluyeron que el transporte de glucosa también en *Candida utilis* pudiera estar regulado en función de la concentración de glucosa en el medio en cultivo continuo (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989) o en ensayos *in vitro* (Barnett y Sims, 1976).

A su vez, es posible explicar el cambio aparente de la capacidad máxima de consumo de azúcares. El metabolismo de la glucosa y de la maltosa difieren en los pasos del transporte y de la hidrólisis necesaria del disacárido. Por lo tanto, se podría situar el motivo fisiológico en dos niveles distintos, transporte e hidrólisis o en el metabolismo posterior. La suma de ambos factores resultará en la tasa glucolítica efectiva de los azúcares. La tasa de crecimiento está directamente relacionada con la velocidad del metabolismo, de cuya magnitud da idea la tasa de consumo de las fuentes de carbono. Podemos expresar esta relación de esta manera:

$$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{\text{glucolisis}}{\text{glucolisis máxima}} \right) \quad (3.13)$$

Esta expresión sería cierta si se considerara que, para cualquier concentración de sustrato, la levadura puede convertir los azúcares en biomasa con una efectividad constante. Esta efectividad sería similar a  $Y$ . Esto es lo que sucede en nuestros resultados experimentales, pues no hemos encontrado diferencias sustanciales en los  $Y$  con los distintos azúcares, fueran únicas o en mezclas, a pesar de que las tasas de consumo eran variables en función de los sustratos. Además, se ha descrito que el rendimiento en crecimientos sobre fuentes glucolíticas es aproximadamente constante a lo largo de la mayor parte de las tasas de crecimiento en *Candida utilis* (Schwartzkoff y Rogers, 1982; Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989). Sin embargo, si considerásemos la ecuación 3.13 para *Saccharomyces cerevisiae*, deberíamos introducir un factor de corrección que estuviera en función de la concentración de sustrato. Esta levadura es Crabtree positiva, es decir, cuando la concentración de azúcares es suficientemente alta, el metabolismo preferente es el fermentativo, lo que puede ocasionar cambios en la relación de la cantidad de sustrato que se ha de consumir para que se forme cierta cantidad de biomasa.

Distintos autores indican que la capacidad para consumir un sustrato está fuertemente relacionada como la velocidad con que este sustrato, maltosa o glucosa, es transportado dentro de la célula, al menos en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (como revisiones ver van Uden, 1967; Lagunas y col., 1982; Osinga y col., 1988; Osinga y col., 1989; Gancedo y Serrano, 1989; Weusthuis y col., 1994b). Se podría esperar que la adición

de otra fuente de carbono, además de la glucosa, aumentara la  $\mu$  observada en cultivos con glucosa como fuente única, puesto que la maltosa y la glucosa no comparten los mismos sistemas de entrada en la célula. Es decir, se esperaría un efecto aditivo en los cultivos mixtos, donde la  $\mu$  fuera la suma de las tasas de crecimiento de la levadura sobre cada una de las fuentes de carbono. Al contrario, el valor observado de  $\mu$  en los cultivos con mezclas de fuentes de carbono no es muy distinto de la tasa de crecimiento encontrada en cultivos con glucosa. De esta manera, podemos conjeturar que las etapas de transporte tienen poco efecto en las capacidades máximas de consumo de sustrato cambiantes. Más bien, podemos presuponer que en ambos casos se ha llegado a una saturación del flujo metabólico. Esta conjetura viene avalada por los resultados encontrados en la bibliografía. Con la técnica del cultivo continuo se ha determinado que el flujo estable de hexosas en cultivos con glucosa se sitúa en torno a 5 mmol/g·h (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989), siendo superiores a las de consumo de maltosa. Podríamos deducir que la tasa máxima de consumo de hexosas podría encontrarse en los cultivos con glucosa. Nuestros resultados en la determinación de las tasas de consumo de glucosa en cultivos discontinuos se acercan a esta valor máximo. Por lo tanto, pudieramos presumir que la tasa de glucolisis en cultivos con glucosa como única fuente de carbono estarían cercanos a la saturación de la glucolisis. En crecimientos con la mezcla de azúcares, puesto que la tasa de crecimiento era semejante a la de cultivos en glucosa, también asumimos una situación cercana a la saturación del flujo glucolítico, siendo la levadura incapaz de alcanzar una mayor tasa de crecimiento.

Por lo tanto, aparentemente, cuando la glucosa y la maltosa son transportadas dentro de la levadura, ésta es incapaz de distinguir la procedencia de las hexosas resultantes y ajusta su flujo metabólico al máximo que impone las condiciones experimentales. De esta manera, las cantidades excedentes de sustrato se acumularían en la célula sin ser consumido. El parámetro afectado en este caso, sería  $q_{max}$ . Esto no sería esperable si en nuestra levadura la fosforilación de la glucosa procedente de maltosa se llevara a cabo específicamente por la glucoquinasa, como sugiere Clifton y col. (1993), pues introduciría un nuevo factor diferencial en el metabolismo de maltosa. Así, los experimentos con la técnica del cultivo discontinuo apuntan la posibilidad de que esta modulación resida en la saturación de la glucolisis, aunque en capítulos posteriores discutamos la posible intervención de la capacidad del transporte de glucosa en el mutante en este fenómeno observado en crecimientos en fuentes mixtas (apartado 3.6.2.3.).

Todos los análisis hicieron sospechar que el consumo de glucosa sería el sujeto de regulación en mezclas de fuentes de carbono, mientras que los parámetros del consumo de maltosa serían casi constantes con independencia de la presencia de glucosa. Creemos que la razón reside en las etapas específicas del metabolismo de maltosa. Peinado y col. (1987a), demuestran la importancia del transporte e hidrólisis de este disacárido para su posterior metabolismo. Ya hemos descrito que la actividad hidrolasa de maltosa es insensible a regulación por glucosa o por maltosa, de forma que el flujo de maltosa que se metabolizaría sería constante en nuestras condiciones experimentales. Los análisis del consumo de la mezcla de fuentes de carbono indicarían que también la capacidad para transportar el disacárido también sería independiente de la presencia de glucosa.

Sin embargo, las reflexiones realizadas en este apartado abren la puerta para preguntarse por el papel regulador de la velocidad del consumo de glucosa ejercido por el transporte del azúcar, coincidiendo con la observación de que la tasa de consumo de glucosa  $q$  depende de la velocidad de crecimiento y concentración de glucosa en cultivo

continuo (Peinado y col., 1989).

Por otro lado, cuando el crecimiento se realizó sobre glucosa y etanol, el mutante consiguió unos rendimientos en biomasa similares a la cepa parental, aunque la cepa mutante es capaz de crecer más rápido que la parental (Tabla XXX). Aparentemente, el mutante SDM-1 consigue que la proliferación celular se efectúe por el metabolismo de las fuentes gluconeogénica y glucolítica simultáneamente de forma más efectiva que la cepa parental.

Podemos concluir, a la vista de los resultados globales obtenidos con los crecimientos en mezclas de sustrato, que el carácter desreprimido de la levadura no implica ventajas sustanciales sobre la cepa parental 3092 y que para que el consumo de maltosa sea suficientemente rápido se requiere una alta concentración de maltosa en el medio.

**Tabla XXX.** Parámetros determinados en los cultivos con mezclas de glucosa-etanol. Comparación entre la cepa parental y la cepa SDM-1.

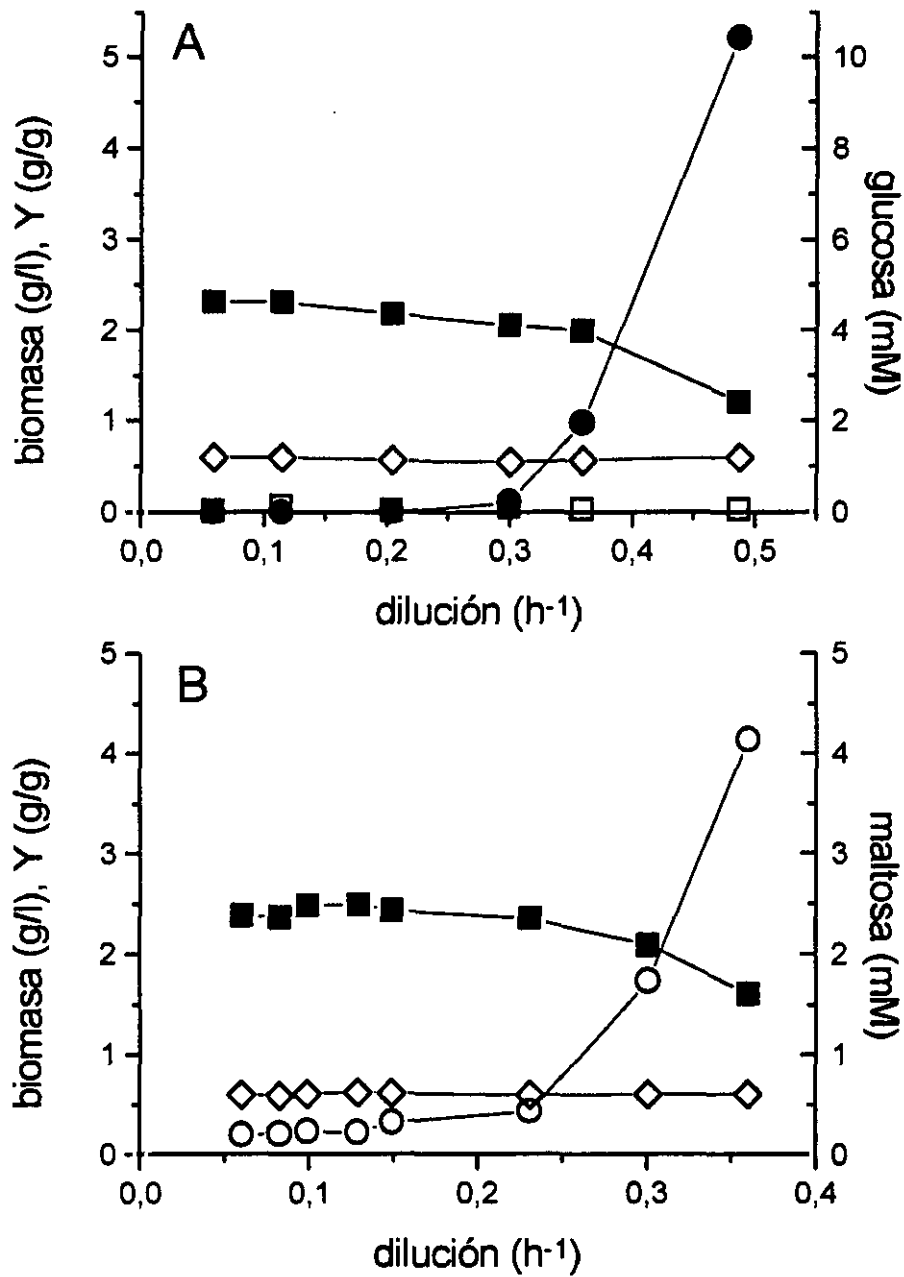
	etanol 0.5%	etanol 0.4%- glucosa 0.1%	etanol 0.1%- glucosa 0.4%
<b>3092</b>			
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.32±0.02	0.32±0.02	0.36±0.01
Y (g/g)	0.59±0.03	0.66±0.04	0.66±0.05
q (g/g·h) <sup>1</sup>	0.54±0.06	0.49±0.05	0.54±0.06
<b>SDM-1</b>			
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.30±0.01	0.41±0.02	0.44±0.01
Y (g/g)	0.57±0.03	0.69±0.04	0.63±0.03
q (g/g·h) <sup>1</sup>	0.52±0.05	0.60±0.04	0.70±0.05

<sup>1</sup> Unidades en g de sustrato consumido cada hora por g de biomasa, debido a la diferente naturaleza de los sustratos utilizados.

**3.5.3.3.2. Cultivos continuos en mezclas.** La aplicación comercial de *Candida utilis* requiere, en general, la utilización de esta técnica. Fue necesario, por tanto, estudiar el comportamiento del mutante SDM-1, que mostró un carácter desreprimido estable en cultivos en matraz, en cultivos continuos.

La primera aproximación fue la caracterización de los parámetros cinéticos del mutante en crecimientos en fuentes de glucosa o maltosa puras (Fig. 24).

Al ajustar los resultados obtenidos cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, nos encontramos el siguiente problema. De forma rutinaria, el ajuste de los parámetros de los datos experimentales se efectúa mediante las ecuaciones de Monod. Sin



**Fig. 24.** Cultivos continuos con distintos azúcares de la cepa SDM-1. **A** Cultivo continuo con glucosa. **B** Cultivo continuo con maltosa. Símbolos: (■) Biomasa (g/l). (●) Glucosa residual (mM). (○) Maltosa residual (mM). (□) Etanol de fermentación (mM). (◇) Rendimiento  $Y_x$  (g/g).



embargo este modelo tiene unas restricciones. Entre ellas, asume que el sustrato limitante es consumido por un único sistema. Hemos descrito ya, que, al menos en el caso de la glucosa, existe un sistema de transporte activo, y otros autores han comunicado la existencia de, al menos dos sistemas de consumo de glucosa con afinidades distintas para el sustrato (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989). Con el fin de comprobar un comportamiento similar en la cepa SDM-1 en crecimientos con glucosa, realizamos un análisis sobre la relación del sustrato residual y la tasa a la que se consume el sustrato de acuerdo a la representación de Hanes (Fig. 25A). Las constantes deducidas, según la ecuación 3.14, revelan que, aparentemente, también esta levadura dispone de dos sistemas con distinta afinidad para consumir glucosa.

$$\frac{S}{q} = \frac{1}{q_{\max}} \cdot S + \frac{K_s}{q_{\max}}$$

(3.14)

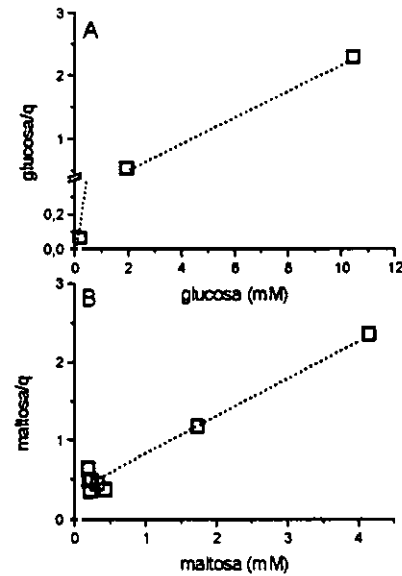
Esta técnica de ajuste ha sido aplicada en los estudios de afinidades por sustrato en cultivos continuos. Según Henderson (1992), facilita la estimación inicial de los parámetros que se desea estimar. Las constantes estimadas con este procedimiento se muestran en la Tabla XXXI.

**Tabla XXXI.** Parámetros deducidos por el ajuste de Hanes en cultivo continuo de SDM-1 en glucosa<sup>1</sup>.

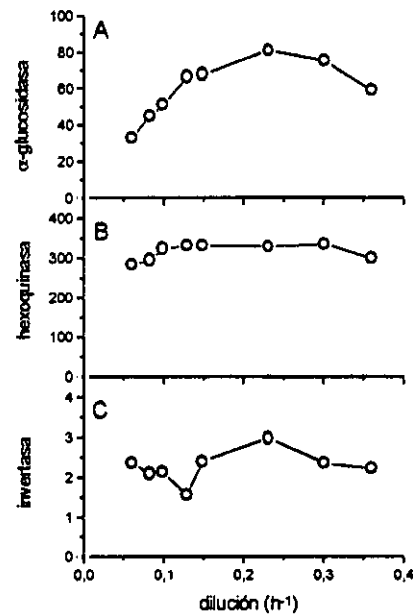
concentración de glucosa (mM)	Ks	q <sub>max</sub>
0-10.4	0.114±0.012	4.56±0.23
0-0.2	<0.01	3.08±0.51
0.2-10.4	0.717	4.88

<sup>1</sup> Valores dados en las siguientes unidades: Ks en mM; tasa máxima de consumo de sustrato en mmol glucosa/(g·h). Los valores obtenidos fueron calculados por regresión lineal.

El cálculo de los valores de la ecuación de Hanes por regresión lineal no resultó el más aconsejable. Ya se ha comentado las ventajas ofrecidas por la estimación mediante regresión no lineal. Sin embargo, la escasa cantidad de glucosa residual obtenida en las fases estables de crecimientos, impidieron un despliegue de los puntos experimentales a lo largo de todo el eje de abscisas, por lo que no fue posible otro tipo de análisis. Las distintas afinidades calculadas, parecen que se corresponden con sistemas de transporte de glucosa diferentes contenidos en *Candida utilis*, según las conclusiones de Postma y col. (1988) y Peinado y col. (1989). De esta manera, aparece una relación entre la capacidad para transportar glucosa y la afinidad con que esta se consume. Esta conclusión no es contradictoria con los resultados expuestos en el apartado 5.3.3.1, puesto que entonces trabajábamos con concentraciones saturantes de glucosa. Por eso, habíamos presumido que las etapas de transporte no serían condicionantes básicos de la velocidad de consumo de



**Fig. 25.** Representación de Hanes, para la determinación de las afinidades del consumo de azúcares en cultivo continuo. **A** Consumo de glucosa (datos de la fig. 24A). **B** Consumo de maltosa (datos de la fig. 24B). Las líneas punteadas representan el ajuste obtenido. El eje de abcisas de la fig. 25A tiene una rotura artificial.



**Fig. 26.** Actividades enzimáticas encontradas en el cultivo continuo con maltosa de la cepa SDM-1. **A** Actividad  $\alpha$ -glucosidasa. **B** Actividad hexoquinasa total (fosforilación de glucosa). **C** Actividad invertasa externa.

glucosa. Sin embargo, la técnica de cultivo continuo permite obtener poblaciones con tasas de consumo de sustrato estables controladas. Durante la mayor parte de la experimentación, estas tasas no saturan la capacidad catalítica de la levadura, por lo que el transporte marcaría la tasa de el consumo. De cualquier manera, este tema será discutido en profundidad en un apartado posterior.

Comprobamos, sin embargo, que la realización de un ajuste a una cinética de Monod, ofrece unos parámetros que pueden explicar razonablemente la evolución de la biomasa en todo el rango de diluciones empleado (Tabla XXXII). Este dato será utilizado en los estudios con mezclas de azúcares.

**Tabla XXXII.** Parámetros de ajuste al modelo de Monod<sup>1</sup>.

$D_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{\max}$ (g/g)	$q_{\max}$	$K_s$ (mM)	$r^2$
0.524±0.010	0.596±0.02	4.884	0.138±0.010	0.979

<sup>1</sup> La tasa de consumo máxima se deduce de acuerdo a la fórmula  $q=D/Y$ .

Así, la  $K_s$  globales dadas por los ajustes de Hanes y Monod son semejantes. Y de igual manera, el valor de  $D_{\max}$ , considerando todo el rango de concentraciones de glucosa es parecido en el modelo de Hanes (0.491±0.102 h<sup>-1</sup>) y en el de Monod.

Se estudió la posible existencia de defectos en el mutante que afectaran a una asimilación efectiva del sustrato. Aunque los resultados de cultivos en discontinuo mostraron que no era probable que se dieran estos defectos, la técnica aplicada ahora es un potente instrumento para revelarlos por el modelo de Pirt, en forma de un término de mantenimiento ( $m$ ) alto. La bibliografía ofrece ejemplos de valores altos de  $m$  en el caso de levaduras afectadas en su metabolismo o intoxicadas (p. ej. Verduyn y col., 1992). Este parámetro hace referencia a la cantidad de sustrato que es tomado por el microorganismo sin que se registre un crecimiento de la población. Los parámetros ajustados mediante este procedimiento indicaron un valor de  $m$  nulo ( $m=-0.028\pm0.022$  mM,  $r^2=0.98$ ), con lo que podemos descartar la existencia de fenómenos de metabolismo de glucosa desequilibrada en el mutante, consistente con las valoraciones de este parámetro en otras cepas de *Candida utilis* (Verduyn y col., 1991).

**Tabla XXXIII.** Parámetros de ajuste al modelo de Monod en la cepa 3092<sup>1</sup>.

$D_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{\max}$ (g/g)	$q_{\max}$	$K_s$ (mM)	$r^2$
0.554±0.009	0.570±0.02	5.399	0.110±0.010	0.985

<sup>1</sup> La tasa de consumo máxima se deduce de acuerdo a la fórmula  $q=D/Y$ .

Los parámetros obtenidos con nuestros ajustes son muy semejantes a los que se

pueden calcular para la cepa parental 3092, según los resultados del cultivo continuo del apartado 3.2.2. (Tabla XXXIII). Aunque es de resaltar que la tasa de consumo máxima de glucosa y la  $D_{\max}$  son menores en el mutante, confirmando las conclusiones en los estudios con cultivos discontinuos.

Por otro lado, se estudió la evolución de la producción de etanol a lo largo de las tasas de dilución. Confirmamos que en las condiciones experimentales utilizadas, no se producen cantidades significativas de etanol, pues se garantiza una correcta presión de oxígeno disuelto.

En el análisis de los resultados realizados cuando la fuente de carbono fue maltosa, encontramos que el método de Monod podía ajustar los valores experimentales mejor que en los cultivos con glucosa. La razón de esto es que el sustrato se consumía, aparentemente, con una afinidad única en el rango de concentraciones de maltosa utilizado (Fig. 25B, con el ajuste de Hanes). Esta afinidad resultó semejante a la  $K_m$  de transporte deducida por Peinado y col. (1987a) y van den Broek y col. (1995). De esta manera, el mutante SDM-1, reproduce las conclusiones avanzadas para *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, donde las cinéticas de transporte aparecen monofásicas (Benito y Lagunas, 1992; Gamo y col., 1995; Peinado y col., 1987a; van den Broek y col., 1995). Los valores de los parámetros calculados se ofrecen en la Tabla XXXIV.

**Tabla XXXIV.** Parámetros de ajuste al modelo de Monod en cultivos con maltosa de la cepa SDM-1<sup>1</sup>.

$D_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{\max}$ (g/g)	$q_{\max}$	$K_s$ (mM)	$r^2$
0.427±0.009	0.601±0.010	2.089	0.221±0.053	0.99

<sup>1</sup> La tasa de consumo máxima se deduce de acuerdo a la fórmula  $q=D/Y$ .

Comprobamos, que aunque la maltosa es un sustrato glucolítico, la  $D_{\max}$  calculada es sensiblemente inferior a la que se calculó en los cultivos con glucosa. Es esperable que en ambos casos, la levadura posea una maquinaria glucolítica para consumir los sustratos del medio de cultivo. Suponemos, por tanto, que la razón de las diferencias respecto a la capacidad de crecimientos con ambos azúcares se encuentre en una fase temprana del metabolismo. Estudiamos la evolución según la  $D$  de una de las enzimas específicas del metabolismo de maltosa: la  $\alpha$ -glucosidasa, de otra actividad compartida en el consumo de glucosa y maltosa, como la hexoquinasa, junto con un control de una actividad no relacionada con el consumo de maltosa, invertasa (Fig. 26).

Encontramos que el nivel de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa depende de la tasa de crecimiento de la levadura. Este resultado contradice, aparentemente, las conclusiones procedentes de los estudios realizados en cultivos discontinuos. Sin embargo, encontramos que los cultivos discontinuos alcanzan unas tasas de crecimientos sensiblemente inferiores a los cultivos continuos. La actividad  $\alpha$ -glucosidasa es similar en ambas condiciones, al comparar los valores obtenidos con ambas técnicas de cultivo. Por otro lado, encontramos que el declive de biomasa se correlaciona con la bajada de actividad  $\alpha$ -glucosidasa en

cultivo continuo con maltosa. Sin embargo, el nivel de actividad hexoquinasa excede la capacidad para consumir maltosa, incluso a las máximas tasas de dilución utilizadas. El control efectuado con el análisis de la invertasa, muestra que esta enzima no depende de la tasa de crecimiento de la levadura. Confirmamos así que la menor capacidad de crecimiento del mutante al utilizar maltosa al compararla con otra fuente glucolítica, se debe a factores que afectan al metabolismo específico de la maltosa.

El mutante tiene una capacidad de crecer en maltosa sensiblemente menor y muestra una afinidad por el sustrato mayor que la cepa parental, de acuerdo a los datos que encontramos en el análisis del crecimiento continuo de la cepa 3092 (**Fig. 27** y **Tabla XXXV**). También la cepa parental asimiló maltosa de forma que se pudo modelizar la cinética de consumo a un solo sistema, como era esperado por los datos de la cinética de transporte de maltosa contenidos en Peinado y col., (1987a).

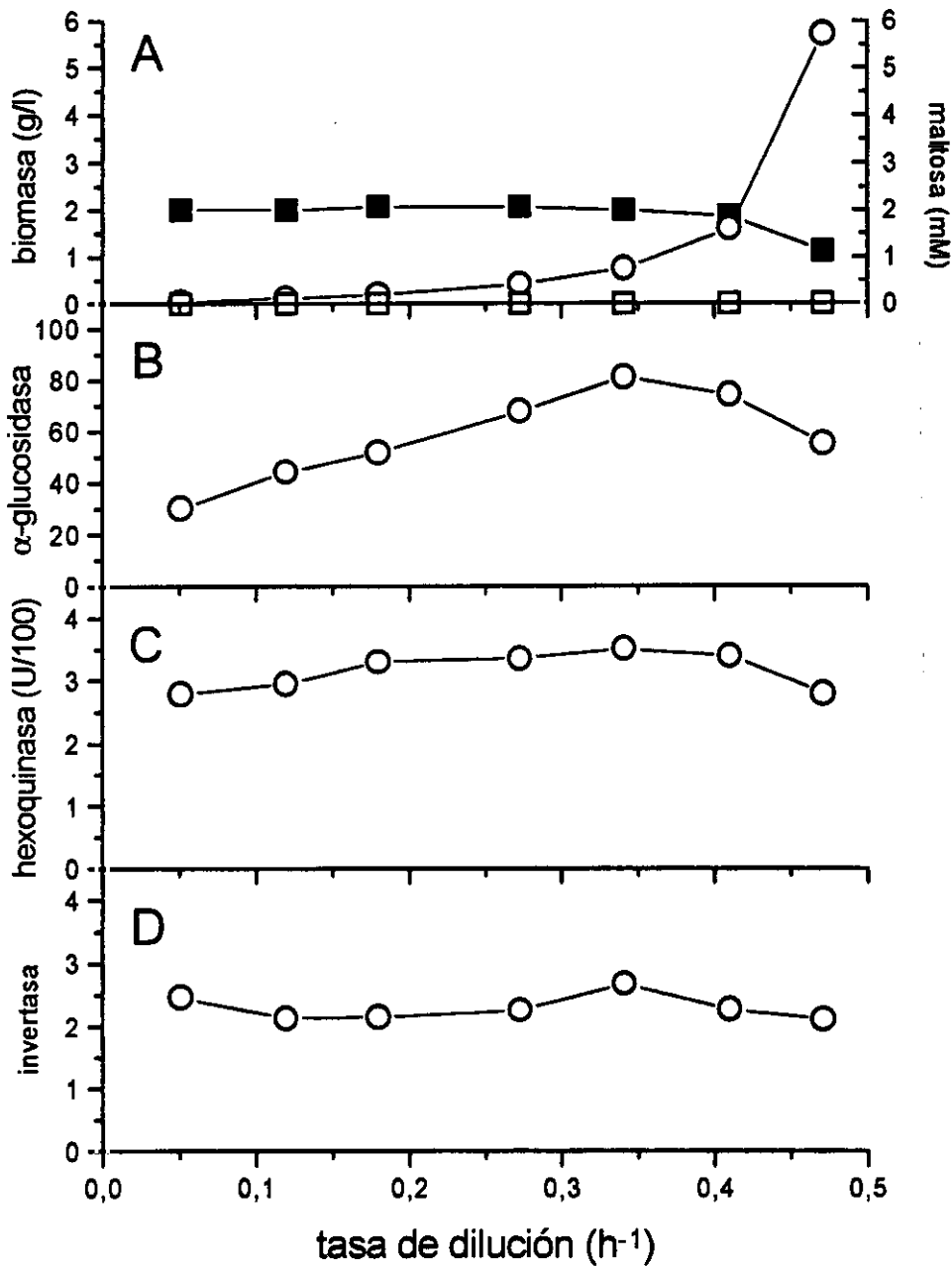
Examinamos ahora otra cuestión: la velocidad máxima de crecimiento que se puede conseguir en cultivo continuo es mucho mayor que la que se observó en cultivos discontinuos en ambas cepas. La afinidad mostrada en cultivos discontinuos es mucho menor la ofrecida en continuo. Esto indica que la concentración inicial de maltosa no llega a saturar la capacidad máxima de la levadura en cultivos discontinuos, por lo que la  $\mu$  observada no pudo ser la máxima. La razón de este fenómeno, pudiera encontrarse en las condiciones ambientales cambiantes propias de los cultivos discontinuos. Un parámetro como el pH externo pudiera influir: En *Saccharomyces cerevisiae* el transporte de maltosa se realiza mediante un sistema de simporte de protones, de forma que los  $H^+$  del medio actúan como un co-sustrato para los transportadores. Las variaciones de pH externo, importantes en cultivos discontinuos, influyen notablemente en la capacidad de la levadura para transportar maltosa (Loureiro-Dias y Peinado, 1984). Un sistema de transporte de maltosa mediado por protones, también ha sido propuesto para *Candida utilis* (van den Broek y col., 1995) en vesículas artificiales de membrana plasmática. Sin embargo, en *Candida utilis* no hemos medido movimiento de protones asociado al transporte de maltosa en células enteras desenergizadas. De esta manera, la medida del transporte de maltosa se ha venido realizando con el uso del análogo PNPG (Peinado y col., 1987a). De cualquier manera, puesto que se ha sugerido una relación entre la concentración de protones y la capacidad para transportar maltosa, el transporte pudiera verse influenciado por pH de igual manera que en *Saccharomyces cerevisiae*.

Como comprobamos en el consumo de glucosa, también la asimilación de maltosa se realiza, mediante un metabolismo netamente oxidativo, de acuerdo a la respuesta positiva con este disacárido en el estudio del efecto Kluyver.

Una vez que se estudió el comportamiento de la cepa mutante en cultivos con azúcares puros, procedimos a estudiar los parámetros de un cultivo mixto, donde las concentraciones iniciales de maltosa (0.3% (p/v)) y glucosa (0.1% (p/v)), reproducen las condiciones experimentales de Peinado y col. (1987a) (**Fig. 28**).

Se empezó a encontrar maltosa libre en el medio a unas tasas de dilución inferiores a las indicadas por Peinado y col. (1987a). El motivo pudiera ser la persistencia de represión catabólica en el mutante en cultivo continuo. Sin embargo, no creemos que este sea el motivo, por las siguientes razones:

► En primer lugar, Peinado y col. (1987a) comunican que la maltosa empieza a no ser consumida cuando la concentración externa de glucosa alcanza el umbral mínimo de



**Fig. 27.** Cultivo continuo con maltosa de la cepa parental. **A** Evolución de la biomasa y maltosa residual en el fermentador. **B** Actividad  $\alpha$ -glucosidasa. **C** Actividad hexoquinasa (ensayada por fosforilación de glucosa). **D** Actividad invertasa. Símbolos: Fig. 27A (■) Biomasa. (○) Maltosa. (□) Etanol. En las otras fig. (○) representa la actividad enzimática determinada.

represión (0.5 mM). Este no es el caso, el aumento de concentración de maltosa residual se da cuando la concentración de glucosa residual un orden de magnitud menor (0.06 mM). Ya hemos comentado que en cultivos discontinuos de mezclas de glucosa y maltosa, el carácter desreprimido de la levadura se mantiene incluso con concentraciones de glucosa 40 veces superiores al umbral de represión de la cepa 3092, por lo que carece de sentido que concentraciones tan pequeñas de glucosa puedan ocasionar represión en el mutante.

► La evolución de la biomasa en función de la tasa de dilución puede ser modelizada según una estimación de un consumo simultáneo de maltosa y glucosa en todas las tasas ensayadas.

El modelo aplicado fue el de Monod para un consumo de 2 fuentes de carbono

$$X = Y_M \cdot \left( M_0 - \frac{K_{sM} \cdot D}{D_{maxM} - D} \right) + Y_G \cdot \left( G_0 - \frac{K_{sG} \cdot D}{D_{maxG} - D} \right) \quad (3.15)$$

Los parámetros utilizados fueron:  $M_0$  y  $G_0$ , los correspondientes a las concentraciones de glucosa y maltosa en el reservóreo.  $Y_M$  e  $Y_G$  fueron de 0.6 g/g, pues el rendimiento fue independiente de la naturaleza de las fuentes de carbono. Los valores de afinidades fueron sustituidos por los correspondientes al análisis de los parámetros de los ajustes de Monod para todo el rango de concentraciones en los cultivos con los azúcares puros.

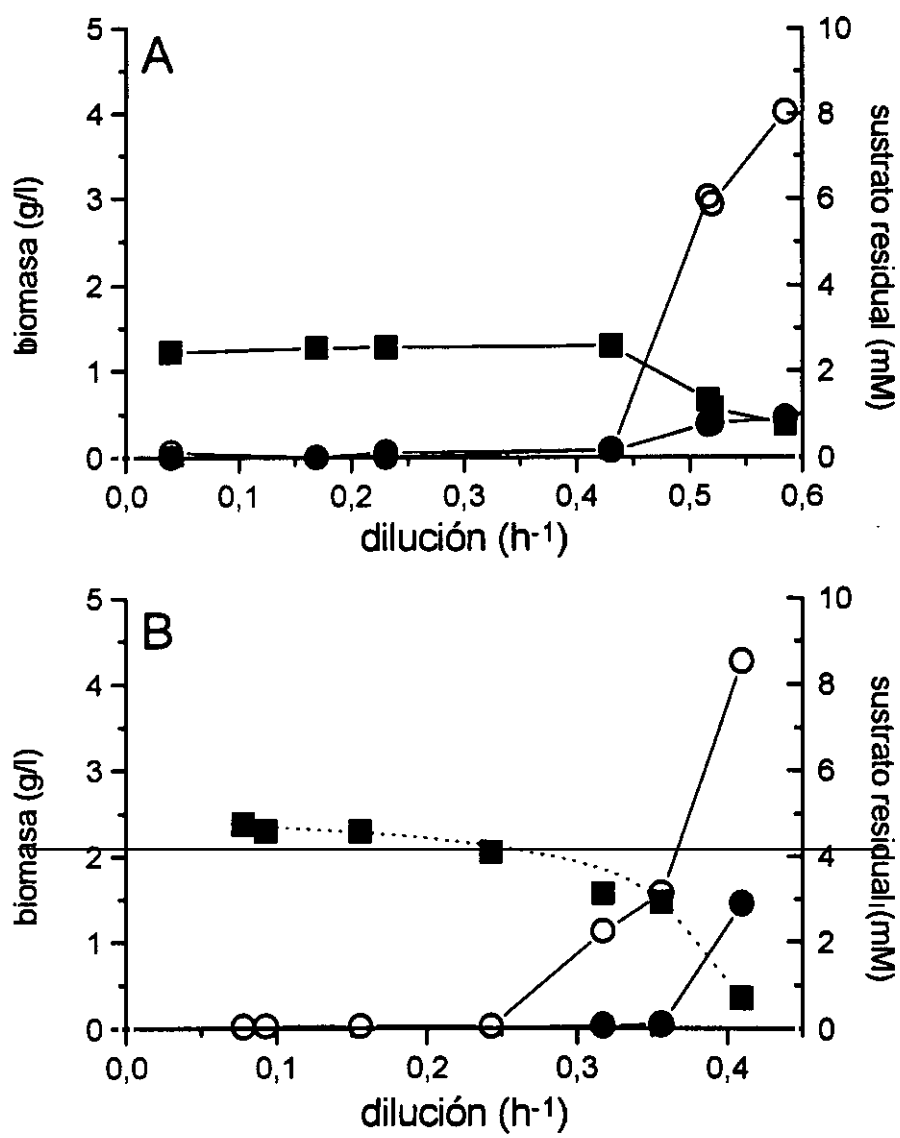
La curva obtenida se muestra en la Fig. 28B, donde se observa un buen ajuste entre los puntos experimentales y los valores teóricos. De esta manera, los resultados del continuo responden al supuesto donde la generación de biomasa se efectúa por la suma del crecimiento en ambas fuentes de carbono, sin interacciones entre ellas.

**Tabla XXXVI.** Parámetros deducidos por el ajuste de Hanes en cultivo continuo de SDM-1 en mezclas glucosa-maltosa<sup>1</sup>.

concentración de glucosa (mM)	Ks	q <sub>max</sub>
0-2.76	0.005±0.001	1.41±0.01
0-0.1	<0.001	1.30±0.01
0.1-2.76	0.150	3.41
concentración de maltosa (mM)		
0-3.24	0.215±0.020	2.64±0.01
0-1.35	0.082±0.001	1.40±0.01

<sup>1</sup> Valores dados en las siguientes unidades: Ks en mM; tasa máxima de consumo de sustrato en mmol glucosa/(g h).

Cuando analizamos la relación de la tasa de toma de sustrato y la concentración residual de cada uno de los sustratos en el fermentador, según el ajuste de Hanes, después



**Fig. 28.** Cultivo continuo en mezclas de glucosa-maltosa. Demostración de la desrepresión de la cepa SDM-1 en condiciones fisiológicas. **A** Cultivo continuo con la cepa parental (reproducido de Peinado y col., 1989). **B** Cultivo continuo de la cepa SDM-1. Símbolos: (■) Biomasa ( $g/l$ ). (●) Glucosa residual. (○) Maltosa residual. La línea punteada en la fig. 27B representa la evolución teórica de la biomasa, asumiendo una asimilación simultánea de glucosa y maltosa (más detalles en el texto).



de estimar los valores de  $q$  individuales para glucosa y maltosa, determinados según la ecuación 3.16, se obtiene la **Tabla XXXVI**.

$$q_s = \frac{D(S_0 - S)}{X} \quad (3.16)$$

Donde  $S_0$  y  $S$  son las concentraciones en el reservóreo y residuales, respectivamente, de cada uno de los azúcares individuales.

Se ha descrito en *E. coli* y otros microorganismos, que la afinidad por la toma de sustratos en mezclas de fuentes de carbono disminuye, cuando se la compara con los datos de cultivos con sustratos únicos, sin que estén muy claras las causas del fenómeno (Egli y col., 1992; Egli y col., 1993). La cantidad residual de los azúcares en el fermentador dependen de las proporciones de sustrato iniciales, la naturaleza de la mezcla de sustratos y el patrón de la regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo de éstos. Esta puede ser la razón que explica la alta tasa de crecimiento de los microorganismos en ambientes naturales, donde la disponibilidad de nutrientes es muy limitada.

Durante la mayor parte de las diluciones utilizadas, la glucosa se consume mediante el sistema de alta afinidad, que ya ha sido descrito en los cultivos continuos con glucosa. Sin embargo, el incremento de afinidad por maltosa es notable. Sólo a las mayores tasas de dilución, la afinidad por este disacárido disminuye. Hemos relacionado este hecho con la pérdida de actividad  $\alpha$ -glucosidasa ocurrida a estas diluciones, como sucedía en los cultivos con maltosa (**Fig. 29**). Sin embargo, el cambio de afinidades en la toma de la mezcla de fuentes de carbono, no implica un aumento de la biomasa final obtenida, puesto que las constantes de crecimiento calculadas en los cultivos sin mezcla de azúcares, pueden explicar la evolución de la biomasa. Tampoco se alteran, aparentemente, la  $D_{\max}$  del mutante con los crecimientos parciales al utilizar cada uno de los azúcares.

Concluimos por tanto que en cultivos en mezclas de azúcares, el mutante mantiene el carácter desreprimido que fue observado en todos los experimentos anteriores. Este dato adquiere importancia por el tiempo requerido para la realización de un experimento de cultivo continuo. Fue preciso en torno a 300 generaciones celulares para completar el experimento y en este intervalo de tiempo ningún mutante con carácter reprimido restaurado desplazó a la población original.

El que la tasa de dilución inicial donde aparece maltosa sin consumir en el medio sea inferior que la hallada en la cepa parental, es debido a la menor  $D_{\max}$  mostrada en el mutante comparada con la cepa parental. En principio, esto pudiera resultar una desventaja si se pretendiera utilizar el mutante en sustitución de la cepa parental para la obtención de biomasa microbiana o para la depuración de residuos con alta cantidad de materia orgánica. Sin embargo, durante un intervalo de  $D$ , la fuente de carbono detectada en el efluente resultó ser maltosa casi pura. De esta manera, se descubre una posible aplicación en la utilización del mutante para la purificación de azúcares en mezclas de azúcares.

#### 3.5.3.4. Regulación de distintas actividades enzimáticas por el flujo glucolítico.

A lo largo del apartado anterior, hemos descrito que las actividades enzimáticas estudiadas en el mutante SDM-1 variaban según la  $D$  a la que fueron tomadas las muestras. Esto parece contradictorio con los datos obtenidos en discontinuo, donde se observó la pérdida casi absoluta de regulación de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa y, parcialmente, de la invertasa.

En el primer caso, observamos que la actividad de hidrólisis de la maltosa puede depender de la velocidad del flujo metabólico. Este dato adquiere importancia desde el punto de vista de una hipotética aplicación comercial del mutante, pues la técnica de cultivo continuo parece ser el modo de obtención de biomasa que encarece menos oneroso. Se ha comunicado, en estudios de cultivo continuo, que ciertas actividades enzimáticas y la cantidad de rRNA que contiene la información para la síntesis de las enzimas están sometidas a una regulación dependiente del flujo metabólico (Sierkstra y col., 1992; Sierkstra y col., 1993; Sierkstra y col., 1994). Estos autores no identifican la causa íntima del fenómeno, pero investigaciones del grupo del Prof. Zimmermann sugieren que la acumulación de determinados metabolitos condicionan el grado de actividad y velocidad de transcripción de determinados genes glucolíticos (Boles y col., 1993a y b; Müller y col., 1995; Boles y col., 1996).

Para confirmar la importancia del flujo glucolítico en la cantidad de actividad enzimática en el mutante, hicimos los siguientes experimentos basados en este abordaje experimental:

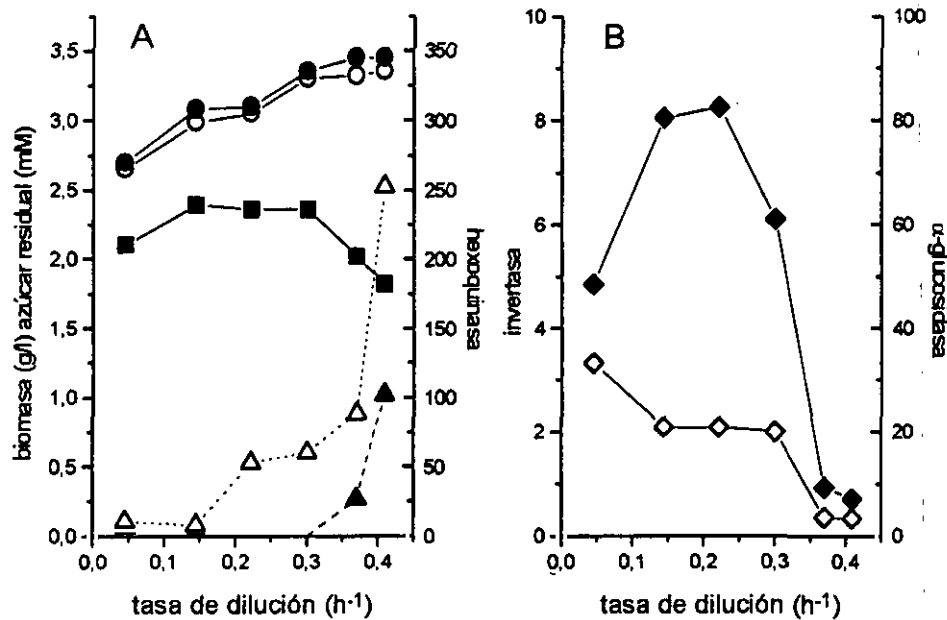
Utilizamos la técnica de cultivo continuo con un sustrato, cuyo consumo procurara un flujo metabólico alto. Este sustrato debería ser glucolítico, pues básicamente con este tipo de residuos se ha venido produciendo *Candida utilis*. Además, la regulación del consumo de este sustrato no debe ser muy compleja. Por último, el sustrato no debe desencadenar represión catabólica.

Un candidato perfecto sería la galactosa, utilizada en los trabajos con *Saccharomyces*. Sin embargo, este sustrato no es asimilado por *Candida utilis* (ver **Tabla XXIV**). Elegimos la sacarosa como fuente de carbono. Es un sustrato no represor, como determinamos en los ensayos con la cepa parental (**Fig. 5**), capaz de sustentar una tasa de crecimiento alta (**Tabla XX**) y, en la misma cepa, parece que su utilización solo está sujeta a represión catabólica. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 30**.

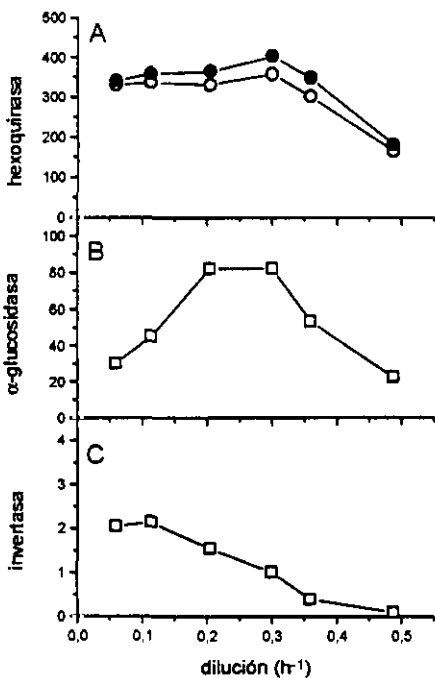
La  $\alpha$ -glucosidasa depende fuertemente de la tasa del flujo de consumo del sustrato. Se observa una curva parecida a la que se observa en un experimento similar con la cepa 3092 (**Fig. 5**), y a la obtenida con cultivos con maltosa en la cepa SDM-1 (**Fig. 26**). Sin embargo, existen fuertes diferencias: En primer lugar, la actividad encontrada en los ensayos con un flujo metabólico lento (a bajas D), es 4 veces superior a la encontrada en la cepa parental. En segundo lugar, aunque la actividad disminuía fuertemente cuando la tasa de dilución era alta y existían cantidades apreciables de glucosa libre en el medio, los valores determinados se corresponden con los niveles basales de actividad de la cepa parental (en torno a 10 U) medida en condiciones de desrepresión en cultivo continuo. En ningún caso, esta actividad cayó hasta los niveles de represión de la cepa parental.

En todas las tasas de dilución ensayadas, la cantidad de actividad total fosforilante de glucosa fue superior a la tasa de consumo del sustrato.

Fue, sin embargo, sorprendente la regulación de la actividad invertasa. La evolución de esta actividad fue inversamente proporcional a la tasa de dilución. Ya mostramos que la invertasa está parcialmente desreprimida en la cepa SDM-1. Aparentemente, la cepa no necesitaba la presencia de sacarosa para que la actividad fuera alta en cultivos discontinuos. Un problema planteado en el análisis de esta actividad es que se localiza en el exterior de las células, de esta manera, la invertasa es lavada junto a las células y medio. Se podría sugerir que nosotros estamos midiendo un lavado de las enzimas que hidrolizan sacarosa. Tenemos que precisar que las determinaciones se realizaron durante las fases de



**Fig. 30.** Cultivo continuo de la cepa SDM-1 con sacarosa. **A** Evolución de la biomasa, azúcares residuales y actividad hexoquinasa total con la tasa de dilución. **B** Actividades  $\alpha$ -glucosidasa e invertasa a las distintas D ensayadas. Símbolos: (■) Biomasa. Actividad fosforilante de hexosas: (●) en ensayos con fructosa, (○) en ensayos con glucosa. (Δ) Sacarosa residual. (▲) Glucosa residual procedente de la hidrólisis de sacarosa. (◆) Actividad  $\alpha$ -glucosidasa. (◇) Actividad invertasa.



**Fig. 31.** Actividades enzimáticas en cultivo continuo de la cepa SDM-1 con glucosa. **A** Actividad hexoquinasa total. **B** Actividad  $\alpha$ -glucosidasa. **C** Actividad invertasa. Símbolos: (○) Actividad fosforilante con fructosa como sustrato. (●) Actividad hexoquinasa en ensayos con glucosa. (□) En las fig. B y C, indica las actividades enzimáticas.

crecimiento estables; de esta manera medíamos, como en el resto de actividades ensayadas, la actividad específica contenida en el fermentador. Esta es independiente de la tasa de lavado y es un carácter propio de la población estable del fermentador. Las unidades utilizadas para la invertasa se refieren a la capacidad de hidrólisis de sacarosa por unidad de volumen, pues es este el modo más común de cuantificar actividades extracelulares en cultivo continuo. Una posible explicación a la evolución de la actividad es que la densidad celular decreciera cuando la D fuera alta. Observamos que esto no ocurre. Los cambios de concentración de biomasa no son suficientes para explicar una variación del orden de 6 veces de actividad a lo largo de todas las D estudiadas. Así, parece, que al igual que lo visto en la cepa parental, la invertasa está regulada negativamente por el metabolismo de su propio sustrato.

Cuando observamos la evolución de esta actividad en la cepa parental y en la mutante con distintas fuentes de carbono, encontramos, que en general, la actividad desciende cuando aumenta la tasa de dilución. Aparentemente, este efecto es independiente de la acción de la represión catabólica. Esto se puede observar también en la cepa SDM-1 en cultivos con glucosa, en las fases donde la cantidad de glucosa es muy reducida, se reproduce el panorama respecto a la actividad  $\alpha$ -glucosidasa e invertasa que observamos en el cultivo continuo con sacarosa (Fig. 31).

Así se puede concluir que en las cepas parental y mutante, el nivel de las actividades enzimáticas implicadas en el consumo de distintas fuentes de carbono depende fuertemente de la tasa metabólica a la que crece las levaduras. Es un efecto independiente de los fenómenos de inducción y represión. Esta respuesta a la velocidad de flujo es similar a la que ya hemos estudiado con los experimentos de inactivación de la actividad hexoquinasa con Cibacron Blue 3G-A, donde el nivel de represión, basal o inducción de las actividades estudiadas también dependía de la velocidad de consumo de sustrato.

Carece, por tanto, de sentido, establecer un valor estático de actividad enzimática para cada uno de los posibles estados fisiológicos de síntesis enzimática: reprimido, basal o inducido.

Tenemos que indicar que, en todos los casos, el nivel de actividad ADH, utilizada como control de una actividad no directamente implicada en el consumo de fuentes glucolíticas, permaneció en niveles de 300-500 U en todos los ensayos (dato no mostrado), siendo invariable con cualquiera de las fuentes utilizadas.

Así, parece que la regulación descrita en *Saccharomyces cerevisiae* se puede reproducir en *Candida utilis*, al menos, para aquellas actividades implicadas en el metabolismo temprano de azúcares. En cualquier caso, las variaciones de actividad enzimática, no afectan a la producción de biomasa durante la mayor parte de las tasas de D, aunque pueden ser responsables de que la  $D_{max}$  encontrada en SDM-1 sea levemente inferior a la que se ha determinado en la cepa 3092, al menos en los casos de crecimientos con maltosa.

### 3.6. Búsqueda de la base de la desrepresión en el mutante SDM-1.

La carencia de una metodología apropiada para el trabajo molecular que nos permitiera determinar el fallo o conjunto de errores en el control de represión catabólica en el mutante, nos forzó a buscar la razón de la desregulación en las características fisiológicas diferenciales que mostraban las cepas SDM-1 y parental 3092.

Los análisis del control de represión de *Saccharomyces cerevisiae* indican que existen eslabones en el control, cuyas carencias pueden ser determinadas mediante un análisis fisiológico del metabolismo.

**3.6.1. Análisis de la actividad hexoquinasa.** Una pieza situada en el circuito superior del control de la represión en *Saccharomyces* se sitúa en el paso de las hexoquinasas, fundamentalmente la HK PII. Procedimos a analizar la actividad total hexoquinasa del mutante en distintas situaciones fisiológicas (Tabla XXXVII).

Los valores obtenidos cuando la actividad hexoquinasa máxima se ensayó en condiciones de determinación óptimas no arrojaron diferencias sustanciales respecto a los valores encontrados en la cepa salvaje, crecida en condiciones semejantes.

Sin embargo, cuando afrontamos el estudio de las actividades encontradas en entornos de pH fisiológicos, observamos que la capacidad del mutante para fosforilar fructosa eran inferiores a las de la cepa 3092, produciendo un descenso de la relación F/G en muestras procedentes de glucosa. Distintos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* desreprimidos lo son por la insuficiencia de actividad hexoquinasa. Este dato nos sugirió que el defecto en el control de represión pudiera encontrarse en una deficiente capacidad de fosforilación en el mutante.

Cuando realizamos las cinéticas de fosforilación de los distintos sustratos que pueden ser utilizados por las hexoquinasas las cinéticas que conseguimos fueron las mostradas en las Fig. 32.

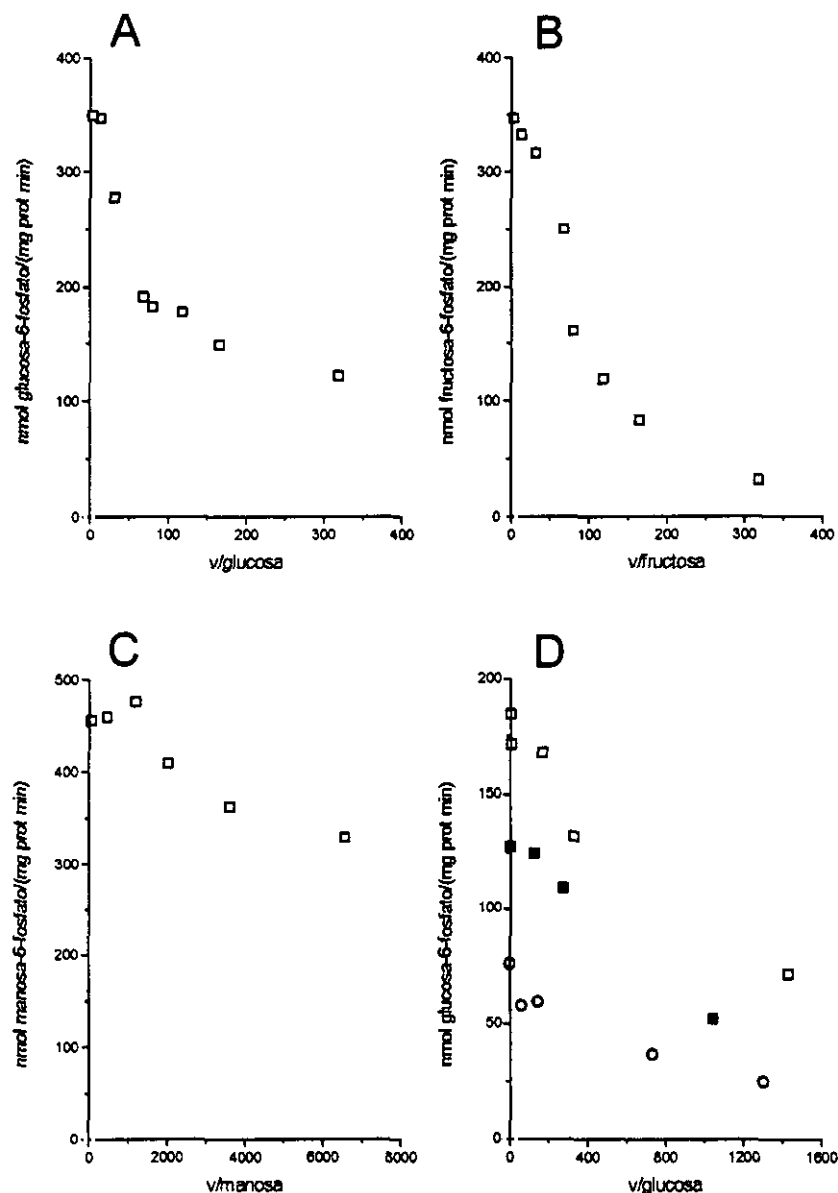
El análisis de los resultados de la fosforilación en el mutante se realizó con distintas aproximaciones, como en el apartado 3.1.1.

Al determinar las constantes cinéticas de fosforilación de manosa, pudimos obtener un buen ajuste con la utilización de modelos con solo un sistema de fosforilación. Como discutimos con la cepa parental, no parece probable que las distintas enzimas encargadas de la fosforilación de este azúcar lo utilicen con afinidades muy diferentes.

Sin embargo, al determinar la afinidad de las hexoquinasas del mutante por ATP, encontramos que los datos experimentales se ajustaban a sistemas con menor afinidad por el nucleótido que las hexoquinasas de la cepa parental. En capítulos posteriores nos preguntaremos por la importancia fisiológica de esta diferencia en el control de la glucólisis en el mutante.

Las diferencias más importantes entre la cepa parental y la mutante, se encontraron al analizar la actividad fosforilante de glucosa y fructosa. Observamos, como describimos para la cepa 3092, que la cinética de fosforilación de fructosa se corresponde a lo esperado de un sistema de fosforilación compuesto de una serie de enzimas que compartían una afinidad semejante para la fosforilación de fructosa, con una  $K_m$  y  $V_{max}$  aparentes muy semejantes a las descritas en la cepa parental (si se considerase el ajuste por un único sistema de fosforilación).

También los ajustes asumiendo un único sistema de fosforilación de glucosa,



**Fig. 32.** Cinéticas de fosforilación de los distintos sustratos para la actividad hexoquinasa de la cepa SDM-1 (representación de Eadie-Hofstee). **A** Fosforilación de glucosa. **B** Fosforilación de fructosa. **C** Utilización de manosa. **D** Fosforilación de glucosa con distintas concentraciones de ATP. Símbolos: Fig. A, B y C, ( $\square$ ) Actividad enzimática. Fig. 32D, ( $\square$ ) Fosforilación de glucosa con ATP 1 mM. ( $\bullet$ ) Fosforilación de glucosa con ATP 0.5 mM. ( $\circ$ ) Fosforilación con ATP 0.2 mM. Nota: aunque en la fig. A se intuya un componente con una  $V_{max}$  aparente de 200 nmol glucosa/(mg prot min), no fue posible modelizar más que una  $V_{max}$  negativa (ver texto).

ofrecen valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  aparentes parecidas a las de la cepa parental. De esta manera, no se podría explicar el resultado de la inversión de la tendencia de la relación F/G obtenida en la determinación de la capacidad de fosforilación de concentraciones saturantes de azúcares en la cepa SDM-1.

Sin embargo, al modelizar las actividades de fosforilación en un sistema de dos componentes, como puede intuirse de la observación de las **fig. 32A y 32B**, encontramos que uno de los sistemas tendría unos valores de actividad de fosforilación negativa (**Tabla XXXVII**). Fisiológicamente el único significado posible sería la coexistencia de una actividad fosforilante de glucosa con un fosfatasa. Se ha comunicado la obtención y caracterización de mutantes de levadura resistentes a desoxiglucosa debido a una actividad fosfatasa. Incluso, esta actividad parece que pudiera residir en una enzima específica de la 2-desoxiglucosa-6-P (Martín y Heredia, 1977; Sanz y col., 1994; Rández-Gil y col., 1995).

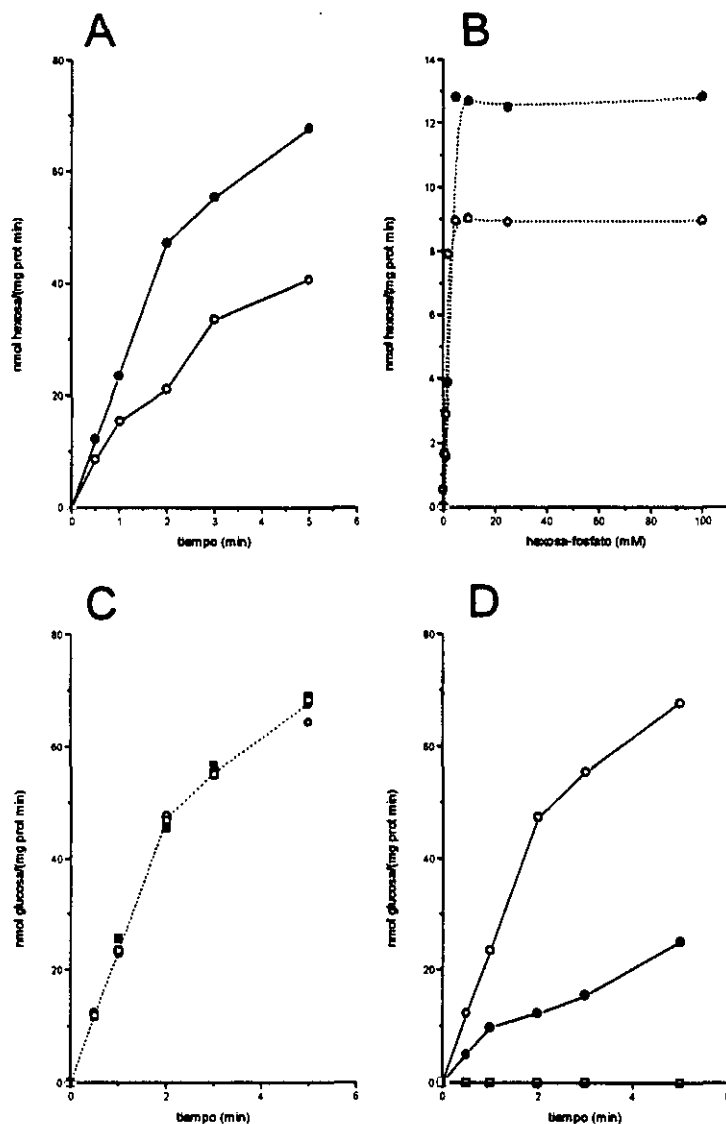
Nos preguntamos, por tanto, si esta explicación pudiera tener un fundamento experimental. Ensayamos la hipotética actividad fosfatasa en el mutante (**Fig. 33**).

Observamos que, existe una actividad, aparentemente independiente de la presencia de ADP u otro nucleótido, en el mutante. Esta actividad resulta ser apreciable cuando las muestras han sido crecidas en presencia de 2-DOG. Sin embargo, no se induce la actividad en muestras que han permanecido un espacio corto de tiempo en presencia del análogo de glucosa. Esta actividad no es detectada en la cepa parental en ninguna de las condiciones ensayadas.

La influencia en el comportamiento fisiológico de esta actividad fosfatasa puede ser importante como mecanismo de defensa a los efectos tóxicos del análogo. Sin embargo, no hemos logrado detectar ninguna actividad fosfatasa en ensayos realizados con 2-DOG, aunque esta observación puede estar mediada por los métodos experimentales utilizados. La detección de 2-DOG libre se realizó con el sistema GOD-Perid de Boehringer. La sensibilidad para la cuantificación del análogo es mucho menor que en el caso de la utilización de glucosa libre (Kunst y col., 1985). Aun así, la hipótesis más probable, es que esta actividad puede actuar también sobre el análogo fosforilado, pues su existencia parece ligada a la presencia de 2-DOG. De cualquier manera, esta actividad puede ser responsable de que la relación F/G en el mutante sea menor en entornos de pH fisiológicos que a pH 8, y que se pueda modelizar un componente de fosforilación con velocidades negativas. Es de resaltar que la actividad fosfatasa no resulta ser específica de 2-DOG-6-fosfato, como se ha descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (Martín y Heredia, 1977; Sanz y col., 1994; Rández-Gil y col., 1995), sino que puede actuar con otras hexosas-fosfato como sustratos. La existencia en esta última levadura de una enzima con actividad fosfatasa específica de un compuesto que no se encuentra fácilmente en ambientes naturales, planteaba una serie de interrogantes puramente especulativos. En principio, parecería razonable que esta actividad tuviera especificidad también por las hexosas-fosfato naturales, como sucede en *Candida utilis*.

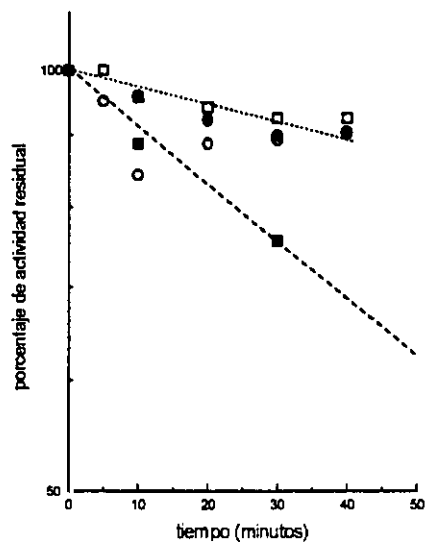
Otro efecto que aparecería, si esta actividad determinada en extractos tuviera valor fisiológico, sería la aparición de ciclos fútiles en el mutante, pues se produciría un bucle de fosforilación-desfosforilación de glucosa con un gasto neto de ATP.

La existencia de un ciclo fútil, desde el punto de vista teórico, pudiera implicar efectos severos en las tasas metabólicas del mutante. Sin embargo, creemos que no tiene consecuencias importantes en el funcionamiento de la levadura. En los cultivos en discontinuo y continuo no encontramos tasas metabólicas muy disminuidas en el mutante,

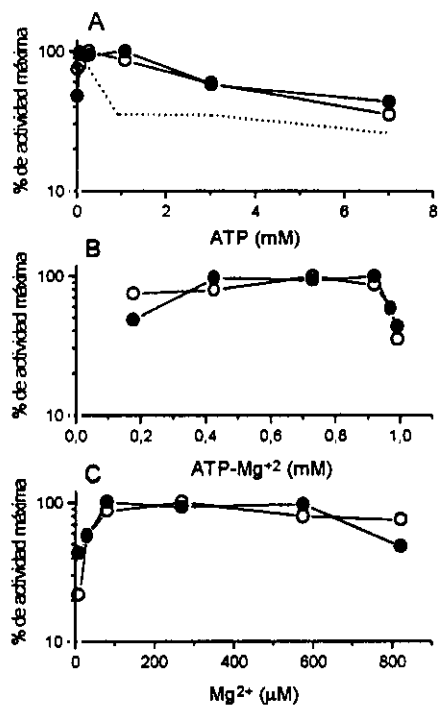


**Fig. 33.** Actividad desfosforilante de hexosas-fosfato en SDM-1. **A** Curso de la actividad a lo largo del tiempo en mezclas con sustratos a una concentración inicial de 10 mM. **B** Relación de la velocidad de reacción frente a la concentración inicial de hexosas-fosfato. **C** Influencia de la presencia de nucleótidos fosfato en la actividad. **D** Actividad fosfatasa en extractos crudos procedentes de células crecidas en presencia o no de sustrato. Símbolos: **A** y **B** (●) Actividad con glucosa-6-fosfato. (○) Actividad con fructosa-6-P. (□) Actividad con 2-DG. **C** (●) Actividad control. (○) Actividad con muestras con ATP 2 mM. (■) Actividad con ADP 2 mM. (□) Actividad con AMP 2 mM. **D** (○) Actividad de muestras de células crecidas en medios glucosa-2-DG. (●) Actividad en células preinoculadas en medio con 2-DG y transferidas una vez a un medio K sin 2-DG. (□) Actividad en muestras precrecidas 2 veces en medio con glucosa, después de un cultivo en un medio con glucosa y 2-DG.





**Fig. 34A.** La cepa SDM-1 es insensible a la inactivación de la actividad hexoquinasa por xilosa. Símbolos: Como en la fig. 2.



**Fig. 34B.** Efecto del ATP libre de magnesio en la actividad hexoquinasa de la cepa SDM-1. Fig. y símbolos como en la Fig. 3.

Parámetros cinéticos de la actividad hexoquinasa, según la abundancia de magnesio

	Km (mM)	Vmax <sup>1</sup>
ATP/Mg>10	0.09	100
ATP/Mg<0.5	0.11	78

<sup>1</sup> Dato expresado en % del valor obtenido con saturación de magnesio

**Tabla XXXVII.** Actividad hexoquinasa en *Candida utilis* SDM-1.

medio	fase exponencial <sup>1</sup>			fase estacionaria <sup>1</sup>		
con:	fosforilación de			fosforilación de		
	glucosa	fructosa	F/G	glucosa	fructosa	F/G
glucosa	355±12	432±21	1.21	301±13	312±16	1.03
fructosa	361±19	425±25	1.17	312±7.5	305±6.7	0.97
manosa	347±11	415±27	1.19	337±5.3	341±12	1.01
maltosa	386±21	403±19	1.04	312±15	325±15	1.06
sacarosa	352±27	395±18	1.12	303±3.3	306±8.7	1.01
etanol	291±9.8	310±12	1.06	256±7.9	267±16	1.04
acetato	300±13	325±11	1.08	287±14	279±23	0.97
glicerol	305±8.6	318±15	1.04	275±16	274±19	0.99
F/G en condiciones fisiológicas (ensayos en saturación de sustrato) <sup>2</sup>						
	glucosa	fructosa	manosa	maltosa	acetato	etanol
exponen.	0.86	0.87	0.91	0.96	0.97	0.95
estacion.	0.87	0.90	0.90	0.99	1.01	1.04
constantes cinéticas (condiciones fisiológicas) <sup>3</sup>						
	1 sistema			2 sistemas		
	Km	Vmax	r <sup>2</sup>	Km	Vmax	r <sup>2</sup>
glucosa						
1	0.12±0.02	320±36	0.94	0.11±0.03	345±12	0.99
2				0.06±0.02	-26±9.5	
fructosa						
1	1.78±0.12	315±27	0.95	1.84±0.26	360±9.7	0.98
2				0.12±0.02	-31±7.8	
manosa	0.02±0.00	455±13	0.97			
ATP	0.70±0.05	-	0.99			

<sup>1</sup> Valores determinados en condiciones óptimas para la medida de la actividad. <sup>2</sup> Valores calculados para una concentración de sustrato de 25 mM. <sup>3</sup> Ajustes por métodos de regresión no lineal (los métodos de ajuste de Michaelis-Menten y Eadie-Hofstee arrojan valores semejantes). - no determinado.

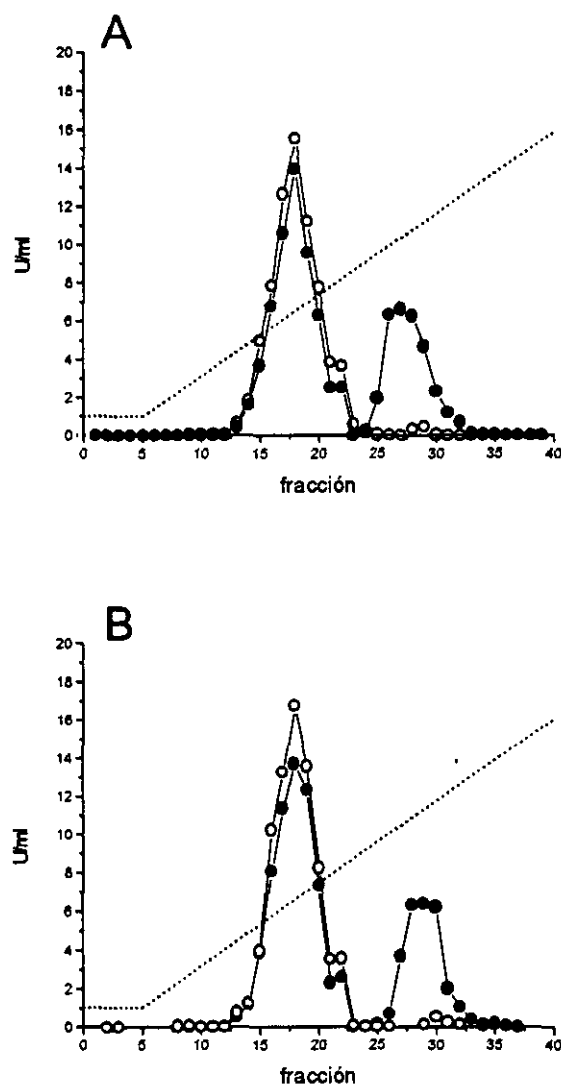
**Tabla XXXVIII.** Impacto de efectores fisiológicos en *Candida utilis* SDM-1<sup>1</sup>.  
inhibición por xilosa (% actividad respecto al control)

xilosa 25 mM		xilosa 100 mM		
fosforilación de glucosa		fosforilación de glucosa		
1 mM	100 mM	1 mM	100 mM	
100±0.1	94±2.0	96±0.7	100±1.5	
Inhibición por trehalosa-6-P (% de inhibición)				
fosforilación de glucosa		fosforilación de fructosa		
1 mM	25 mM	10 mM	25 mM	
Ensayo a 30°C y pH 8				
5.3±2.1	7.6±0.3	0	6.4±1.2	
Ensayo a 28°C y pH 7				
64.0±0.3	36.1±1.8	93.5±1.5	84.3±0.9	
Efecto de la glucosa-6-P en la actividad hexoquinasa				
glucosa-6-fosfato en la reacción				
control	0.1 mM	1 mM	10 mM	25 mM
100	100±0.1	99.8±1.2	101±0.3	99±1.3

Efecto de nucleótidos-fosfato en la actividad hexoquinasa (% de inhibición respecto a los controles)

concentración de ATP en el ensayo: 2 mM			
inhibidor: ADP 2 mM		inhibidor: AMP 2 mM	
fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM	fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM
25.1±1.1	19.3±2.3	5.6±0.1	3.2±0.3
concentración de ATP en el ensayo: 0.2 mM			
inhibidor: ADP 2 mM		inhibidor: AMP 2 mM	
fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM	fosforilación de glucosa 25 mM	fosforilación de fructosa 100 mM
21.2±0.5	22.1±0.7	0.1±0.1	0.3±0.5

<sup>1</sup> Comparar los valores con los mostrados en las Tablas II, III, IV y VI, que contienen los datos conseguidos en la cepa parental



**Fig. 35.** Perfil de actividad hexoquinasa en fracciones recogidas de cromatografías con resinas de hidroxiapatito de extractos crudos de muestras procedentes de cultivos en la fase exponencial con glucosa. **A** Muestras de la cepa 3092. **B** Muestras de la cepa SDM-1. Símbolos: (○) Fosforilación de fructosa. (●) Fosforilación con glucosa. Línea punteada: gradiente de tampón fosfato (5-300 mM). Elución de los picos de actividad: 65-70 mM fosfato (HK 1); 85-90 mM de fosfato (HK 2); 140-160 mM de fosfato (GK). Actividad inicial en ambas muestras: 500  $\mu$ l de extracto conteniendo 1.1-1.2 mg/ml de proteína (AE: 343 y 386 nmol/(mg prot·min) en las muestras de la cepa 3092 y SDM-1, respectivamente).

comparadas con la cepa parental. Aunque, se observa, en general, una escasa disminución en la velocidad del consumo de las fuentes carbonadas, fueran glucolíticas o gluconeogénicas. Las tasas de toma de sustrato levemente menores que se encontraron en el consumo de las fuentes gluconeogénicas no podrían ser explicadas, en principio, por la existencia de un ciclo futil en el paso de fosforilación de hexosas en el mutante, ya que sólo sería preciso este paso para el metabolismo básico de fuentes glucolíticas. Tampoco, los valores obtenidos en los estudios de las cinéticas de crecimiento en cultivo continuo en la cepa SDM-1 parecen que estén afectados por la fosfatasa, pues la actividad disminuye cuando la levadura crece sin 2-DOG.

Se ha comunicado la obtención de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con ciclos fútiles en la vía glucolítica (Navas y col., 1993, Gancedo y Navas, 1995; Navas y Gancedo, 1996). En ese caso, se demostró el efecto pernicioso de la existencia *in vivo* de ciclos fútiles en los mutantes, pues estos disminuían la tasa de crecimiento e incrementaban el metabolismo fermentativo, aunque eran capaces de mantener niveles constantes de ATP.

Por otro lado, recientemente se ha descrito un efecto colateral a la existencia de actividades defectuosas de fosforilación de hexosas en *Saccharomyces cerevisiae*. En mutantes *hxx2 Δ*, se ha encontrado una mayor resistencia al choque térmico que las cepas salvajes (van Dijck y col., 1994). Este no es el caso de la cepa SDM-1, de acuerdo a los resultados de la **tabla XXIV**, donde se examinan las respuestas de las cepas estudiadas a las pruebas para la clasificación sistemática. No apreciamos que la cepa SDM-1 sea capaz de resistir mayor temperatura que la parental.

Todos los datos anteriores, inducen a pensar que la actividad hexoquinasa en el mutante no está afectada, comparándola con la cepa parental.

Abordamos posteriormente el estudio de la regulación de la actividad hexoquinasa en el mutante por distintos efectores con interés fisiológico (**Fig. 34** y **Tabla XXXVIII**).

Existen leves diferencias cuando se compararon los efectos de los reguladores de la actividad en la cepa parental y en el mutante, fundamentalmente en lo referente a AMP y ADP. El mutante mostró una actividad hexoquinasa menos sensible a estos nucleótidos que la cepa parental. El efecto de otros reguladores fue semejante cuando se hizo el estudio comparativo entre ambas cepas.

Cuando enriquecimos las actividades fosforilantes de hexosas contenidas en el mutante, mediante métodos cromatográficos, no encontramos diferencias, al comparar las muestras de la cepa parental y mutante, respecto a la concentración de tampón de lavado donde elufan los picos de actividad, ni en las actividades enzimáticas recogidas en las fracciones (**Fig. 35**). Tampoco encontramos diferencias respecto a la movilidad electroforética de hexoquinasas nativas de SDM-1 y la cepa parental. Se pudo distinguir dos bandas con afinidad para la fosforilación de fructosa y 3 que utilizaban glucosa como sustrato. Las movilidades relativas determinadas fueron, para la GK,  $R_f 0.44 \pm 0.01$ , para la HK 1,  $R_f 0.42 \pm 0.01$  y, para la HK 2 encontramos un  $R_f$  de  $0.47 \pm 0.01$ .

En cualquier caso, la única diferencia importante encontrada en el mutante en la comparación con la cepa parental fue determinada respecto a la fosforilación de glucosa y fructosa en las condiciones que asumimos que fueran semejantes a las fisiológicas. Se podría especular sobre la influencia de este defecto en la desrepresión del mutante, pero no tenemos suficientes bases experimentales para elaborar una explicación suficientemente coherente. Es más, nos inclinamos a pensar que este fenómeno no tendría relación con la

desrepresión, según los resultados de los apartados 3.2.2 y 3.3.2.2.

**3.6.2. Estudio de las cinéticas de transporte de glucosa.** Ya hemos indicado en distintas oportunidades, que el transporte de azúcares puede ser un paso crucial en el metabolismo de estos compuestos, no sólo por la capacidad para controlar el flujo metabólico, sino también porque parece que, al menos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* es una etapa controlada por la represión catabólica o, al menos, por las hexoquinasas (Bisson y Fraenkel, 1983b; Bisson y col., 1987; Bisson, 1988; Prior y col., 1993). Además, se han descrito distintos mutantes en varias especies de levadura con defectos en el control de represión catabólica debido a la escasa capacidad de transportar azúcares fermentables (Boze y col., 1989; Novak y col., 1990; Alamäe y Sismisker, 1994).

Estos datos bibliográficos señalaron la conveniencia de determinar el transporte de glucosa en nuestra levadura para determinar si el fallo en el control de la represión pudiera encontrarse en un deficiente actividad transportadora de glucosa.

En *Candida utilis* se han realizado distintos estudios sobre esta actividad, tanto en células crecidas en discontinuo (Barnett y Sims, 1976a; Barnett y Sims, 1976b) como en continuo (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989). Las conclusiones alcanzadas por cada uno de los autores son discrepantes respecto a los sistemas contenidos en nuestra levadura y la regulación del transporte. Barnett y Sims indican que se puede distinguir dos sistemas de transporte con afinidades de 0.2 mM y 10 mM y que la afinidad por el transporte depende de la concentración externa de glucosa. Este efecto fue explicado entonces por un fenómeno de cooperación negativa de la glucosa sobre un único sistema de transporte. Peinado y col. (1989) coinciden con la interpretación de los resultados globales dada por los anteriores autores, aunque sólo para el sistema de transporte mediado por difusión facilitada. Para entonces, ya se habían descrito la existencia de sistemas de transporte activos de glucosa en levaduras (Loureiro-Dias, 1988) y, en especial, en el género *Candida* (Spencer-Martins y van Uden, 1985) y otras levaduras Crabtree negativas (van Urk y col., 1989). Tanto Peinado y col., como Postma y col. (1988) describen un sistema de alta afinidad que resulta estar mediado por un cotransporte de la glucosa con los protones del medio. La afinidad de este sistema es de cerca de 20  $\mu$ M. Este sistema es inducible por la presencia de bajas concentraciones de glucosa y reprimible por altas concentraciones del azúcar. Respecto al sistema de difusión facilitada, los trabajos realizados en continuo (Postma y col., 1988 y Peinado y col., 1989) concluyeron que la afinidad del transporte por difusión facilitada es dependiente de la tasa de crecimiento y de la concentración externa de glucosa. Pero, la interpretación de los resultados dada por Postma y col. (1988) introduce la posibilidad de la existencia de distintos sistemas de transporte de glucosa por difusión facilitada con afinidades distintas para la glucosa. La presencia de estos transportadores estaría condicionada, al igual que el sistema de transporte activo, por la concentración de glucosa. La base fisiológica de la regulación aparente de la actividad transportadora de glucosa por difusión facilitada no se han dilucidado.

Nosotros creemos que parte de las discrepancias de los resultados vienen por los diferentes métodos para la medida de transporte de glucosa. De la inexactitud de la medida de la actividad del transporte en el pasado da idea el dato de  $V_{max}$  de transporte encontrada en Barnett y Sims (1976a). Esta actividad explica sólo el consumo de 2.4 mmol/g·h en *Candida utilis*, que resulta ser aproximadamente la mitad de los valores de consumo de glucosa encontrados en nuestra levadura en crecimientos en discontinuo.

Con los métodos vigentes en la década de los 80 derivados de la metodología básica enunciada por Bisson y Fraenkel (1983b), se pudo determinar la existencia en *Saccharomyces cerevisiae* de, al menos, dos sistemas de transporte de glucosa con afinidades de 1 y 20 mM, respectivamente. Las características cinéticas de los distintos sistemas de transporte de glucosa en esta levadura se determinaron por la naturaleza bifásica de las representaciones de Eadie-Hofstee. El componente de baja afinidad fue detectado sólo cuando la levadura se encontraba en estado de represión y la existencia del sistema de alta afinidad depende de la actividad fosforilante de hexosas. Estas técnicas se utilizaron en los trabajos de Postma y Peinado.

Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un nuevo sistema para la determinación del transporte de azúcares (Walsh y col., 1994a). Este nuevo método impone la utilización de un tampón que evita la incorporación de más glucosa marcada dentro de la célula cuando se desea parar la reacción, que contiene altas concentraciones de glucosa no marcada a unas temperaturas sensiblemente inferiores a 0°C. La utilización de altas concentraciones del sustrato no radiactivo, cuya actividad de transporte se pretende observar, es común en el caso de aminoácidos (Veramp y col., 1993). Las variaciones metodológicas eliminan algunos de los problemas y errores experimentales que podían encontrarse con la utilización del método de Bisson y Fraenkel:

- Previene la pérdida de linealidad en las representaciones de actividad de transporte frente a concentración de células que puede ocurrir con la utilización del protocolo de Bisson y Fraenkel.
- Evita paradas de reacción lentas y la pérdida de marcaje en las células por el metabolismo de la glucosa transportada hasta CO<sub>2</sub>. Se sospecha que este fenómeno no es interrumpido totalmente con temperaturas superiores a 0°C.
- Elimina gran parte de la unión inespecífica de la glucosa a la levadura.

Los autores que propusieron este nuevo procedimiento, comunicaron que la cinética de transporte de glucosa puede ser sensiblemente distinta a la tenida como cierta tradicionalmente cuando aplican las variaciones comentadas anteriormente. Se observa una reducción de la cantidad azúcar unido a las células cuando la concentración de glucosa en la mezcla de reacción es superior a 50 mM y la velocidad con que se transporta glucosa es constante, con independencia de las condiciones de represión o desrepresión en que las células han sido recogidas.

El grupo de Bisson (Coons y col., 1995) ha publicado recientemente objeciones respecto a las reformas metodológicas planteadas por Walsh y col. (1994a). Estas se apoyan en criterios teóricos del transporte por difusión facilitada. Estiman que los pasos intermedios de la reacción de transporte, donde el sustrato atraviesa la membrana plasmática, son muy sensibles a la temperatura del ensayo (Sen y Widdas, 1962), de forma que estiman que la parada del transporte por el uso de temperaturas bajas no es aconsejable. Lamentablemente, no aportan ninguna evidencia experimental que apoye sus razonamientos. Incluso, existen resultados que indicarían que las cinéticas de transporte en *Saccharomyces cerevisiae* no estarían afectadas por la temperatura (van Iersel y col., 1995).

La exposición breve referida a la metodología para medir el transporte de glucosa indica que, en principio, es aconsejable la utilización de la variación del grupo de van Dam

para la determinación del transporte en 5 segundos de glucosa.

Realizamos una serie de pruebas con nuestras cepas con el método de Walsh y col. (1994a), para determinar si las condiciones válidas para *Saccharomyces cerevisiae*, lo son también para *Candida utilis*. Comprobamos que la adición de un tampón con altas concentraciones de glucosa no marcada y temperaturas por debajo de 0°C evita la pérdida de radiactividad contenida en muestras filtradas y mantenidas fuera del vial de centelleo hasta un máximo de 30 segundos.

No observamos diferencias de transporte cuando los ensayos se realizaron a un pH 4.5 en vez de 6.5 como impone el método original. Utilizamos un pH 4.5, al ser éste el inicial en los medios de cultivo K.

De igual manera, la radiactividad absorbida por las células, resulta proporcional a la concentración de biomasa, al menos en los ensayos realizados hasta un 10% (p/v) de peso húmedo de biomasa.

A su vez, verificamos que el paso de filtración de la mezcla de células y tampón con glucosa con las membranas de filtración utilizados en el protocolo original de Walsh y col. (1994a) eliminaba la presencia de células en el filtrado. De esta manera, no fue preciso sustituir el tipo de membrana por otros de distinto tamaño de poro o de otra composición, como sugieren Coons y col. (1995).

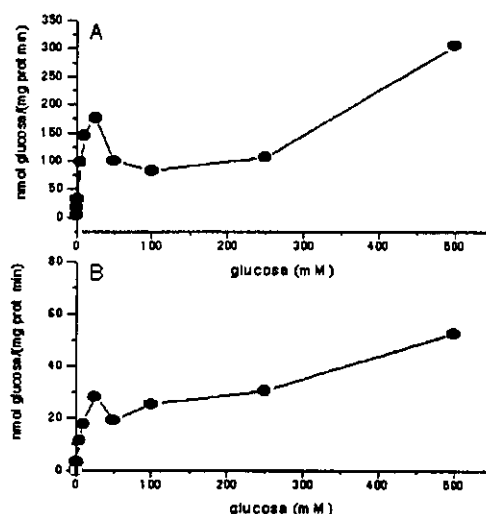


Fig. 36. Experimentos de transporte de glucosa utilizando soluciones de sustrato que contenían etanol (células crecidas en glicerol). A Cepa 3092. B Cepa SDM-1.

Sin embargo, fue preciso la evaporación total de los restos de etanol en la preparación de las distintas concentraciones de glucosa marcada. Este etanol procede de las preparaciones comercializadas por el fabricante de glucosa marcada, que se envasa en una solución conteniendo alrededor del 3% de alcohol. Cuando los ensayos se realizaron con suspensiones glucosa que mantenían restos de etanol, se obtuvieron el tipo de cinéticas mostradas en las Fig. 36. Las cinéticas de incorporación de glucosa marcada no se



correspondieron con cinéticas de saturación y se aprecian fenómenos similares a los que se esperan en caso de la existencia de membranas permeabilizadas.

Nuestra levadura es muy sensible a la permeabilización de membrana por etanol (*leakage*), y puede determinarse la salida al medio externo de compuestos celulares tras tratamientos con etanol en nuestra levadura (Villar, 1992). Además, ya se han descrito procesos de inhibición del transporte de azúcares por la presencia de etanol (van Uden, 1989).

Una vez optimizado el método para la determinación de la actividad total de transporte instantáneo de glucosa, procedimos a realizar los experimentos con las dos cepas de trabajo, extraídas de cultivos en discontinuo en diferentes fuentes de carbono.

Está generalmente aceptado la utilización de métodos de ajuste no lineales para la determinación de las cinéticas de transporte de azúcares, sea por el método de Eadie-Hofstee sea por el método directo de Michaelis-Menten (Leatherbarrow, 1990; Henderson, 1992; Fuhrmann y Völker, 1993). El análisis matemático realizado para la determinación de los parámetros cinéticos se realizaron en función de los ajustes siguientes:

► Un sólo sistema de transporte: Modelo de Michaelis-Menten y ecuación de Eadie-Hofstee.

► Dos sistemas de transporte (al menos): Modelo de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{Vmax_1 \cdot S}{Km_1 + S} + \frac{Vmax_2 \cdot S}{Km_2 + S} \quad (3.17)$$

y modelo de Eadie-Hofstee

$$v = -Km_1 + \frac{v}{S} + Vmax_1 + Vmax_2 \cdot \frac{Km_1 + S}{Km_2 + S} \quad (3.18)$$

Además, últimamente se ha sugerido que parte de la glucosa que se transporta en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* se debe a un componente de difusión pasiva (Fuhrmann y Völker, 1992; Wrede y col., 1992; Fuhrmann y Völker, 1993; Völker y col., 1995) o por la existencia de poros para glucosa (Fuhrmann y col., 1995; Reinhardt y col., 1995). En este caso, la modelización de los resultados experimentales, se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Modelo de Michaelis-Menten y difusión:

$$v = \frac{Vmax \cdot S}{Km + S} + d \cdot S \quad (3.19)$$

Donde el término  $d \cdot S$  se refiere al componente de difusión o cantidad de glucosa transportada a través de un poro.

Modelo de Eadie-Hofstee con un componente de difusión:

$$v = -Km + \frac{v}{S} + Vmax + d \cdot (Km + S) \quad (3.20)$$

**3.6.2.1. Cinéticas de transporte en condiciones de desrepresión.** Los primeros análisis realizados fueron en células que crecieron sobre glicerol. Obtuvimos las cinéticas mostradas en la Fig. 37A. Procedimos a ajustar los datos experimentales según los modelos citados y obtuvimos los siguientes parámetros ajustados (Tabla XXXIX).

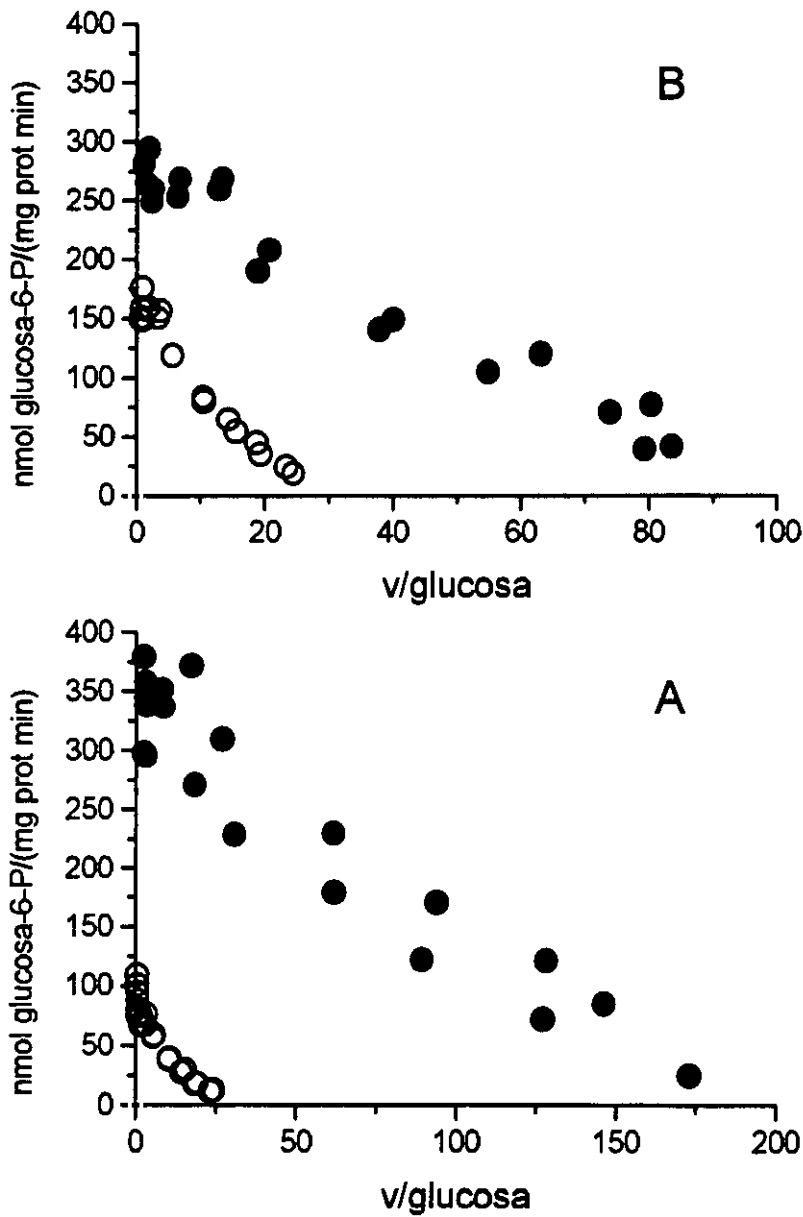
Los abordajes de análisis que arrojaron un mejor ajuste fueron, en general, los realizados con los modelos de cinéticas michaelianas con las representaciones directa de los datos, de acuerdo a lo expuesto por Henderson (1992), que recomienda la realización de los estudios de las características cinéticas mediante modelos directos de ajuste.

Los valores de velocidad máxima determinados en la cepa parental fueron muy superiores a los que generaron los experimentos con la cepa mutante. Esto se reflejó con todos los sistemas de ajuste utilizados, y resultó ser la diferencia más importante encontrada en el estudio comparativo entre ambas cepas.

Al considerar los componentes encargados de transportar la glucosa con las técnicas de ajuste complejo, encontramos en ambas cepas un componente de gran afinidad por el transporte ( $K_m$  en el rango de  $10^{-2}$  mM), que identificamos como el sistema de transporte activo, cuya existencia en condiciones de desrepresión ha sido comunicada por distintos autores (Postma y col., 1988; Peinado y col., 1989). La cantidad de glucosa transportada por este sistema resulta ser minoritario al compararlo con la capacidad total de transporte contenida en ambas cepas, aunque la  $V_{max}$  calculada de este componente fue semejante a los valores deducidos por Peinado y col. (1989) para cultivos en discontinuo con glicerol. Las diferencias fundamentales entre ambas cepas ensayadas se observaron en el componente de transporte no ligado a un cotransporte con protones. La cepa parental es capaz de transportar gran cantidad del azúcar. De esta manera, en la representación gráfica de los resultados se pudo intuir la existencia de un sistema de transporte responsable de la mayor proporción de glucosa transportada y el sistema de alta afinidad sólo resultó revelado mediante los análisis estadísticos. Sin embargo, fue notorio que la cepa mutante mostró escasa capacidad de transporte instantáneo del azúcar.

Como se ha discutido la existencia en *Saccharomyces cerevisiae* de otros sistemas de transporte, además de la difusión facilitada, como la difusión pasiva o transporte a través de poros (Fuhrmann y Völker, 1992; Wrede y col., 1992; Fuhrmann y Völker, 1993; Völker y col., 1995; Fuhrmann y col., 1995; Reinhardt y col., 1995) que apoyan otros análisis del transporte en levaduras (Gonçalves y Loureiro-Dias, 1991; Grobбен y Herweijer, 1991), nos preguntamos si nuestros datos pudieran dar peso a la idea sustentada por el grupo del Prof. Fuhrmann. Aunque se puede deducir la existencia de cierta cantidad de glucosa que pudiera entrar en la célula sin transportador o por un poro, las correlaciones de los ajustes no son buenas en el caso de la cepa parental. En el caso de la cepa SDM-1, el valor atribuible a este nuevo componente se movía en un rango amplio, aunque el ajuste fuera mejor que en la cepa parental. La posibilidad de la existencia real de este componente se comprobará en los estudios con células provenientes de glucosa (apartado 3.6.2.2.).

Peinado y col. (1989) encontraron la explicación de la respuestas del transporte de glucosa en función de la concentración externa de glucosa por fenómenos de cooperatividad. Nosotros hemos procedido a realizar los análisis correspondientes para determinar la viabilidad de este fenómeno tras determinar el transporte con estas nuevas técnicas (Fig. 38). Encontramos que no existen motivos para estimar la existencia de estos fenómenos en el transporte de glucosa.



**Fig. 37.** Representación de Eadie-Hofstee de las cinéticas de transporte de glucosa en experimentos de 5 s. Muestras procedentes de cultivos discontinuos de medios YPD con concentraciones iniciales de sustrato de 2% (p/v). **A.** Cinéticas en células procedentes de medios con glicerol. **B** Muestras procedentes de medios con glucosa. Símbolos: (●) Cinéticas en la cepa 3092. (○) Cinéticas en la cepa SDM-1.

**Tabla XXXIX.** Ajuste de la cinética de transporte de glucosa en células exponenciales crecidas en YP-glicerol 2% (p/v) a distintas ecuaciones<sup>1</sup>.

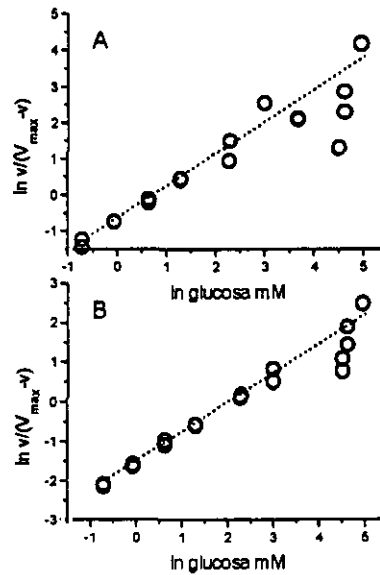
		cepa 3092				cepa SDM-1			
modelo		V <sub>max</sub>	Km	d	r <sup>2</sup>	V <sub>max</sub>	Km	d	r <sup>2</sup>
Directa simple		354±2.98	1.87±0.20	-	0.99	91.2±2.59	5.17±0.57	-	0.97
Eadie-Hofstee simple		355±3.45	1.88±0.19	-	0.98	86.0±3.36	3.51±0.29	-	0.98
Directa compleja	sist. 1	6.6±0.07	0.01±0.01	-	0.95	10.2±4.95	0.01±0.02	-	0.94
	sist. 2	348±8.53	1.97±0.25	-		85.3±5.10	8.41±2.48	-	
Eadie-Hofstee compleja	sist. 1	5.51±1407	5.55±775	-	0.82	12.0±13.9	0.46±0.71	-	0.93
	sist. 2	350±1414	1.92±4.53	-		79.5±12.4	6.49±2.57	-	
Directa con difusión libre		354±18.3	1.87±0.32	0.001±0.18	0.94	68.6±4.41	2.32 ±0.52	0.22 ±0.04	0.97
Eadie-Hofstee con difusión libre		275±42.7	1.51±0.77	0.74±0.46	0.55	67.0±3.58	2.47±0.23	0.24±0.23	0.96

<sup>1</sup> V<sub>max</sub> en nmol glucosa/(mg proteína·min); Km en mM; d en µl/min.

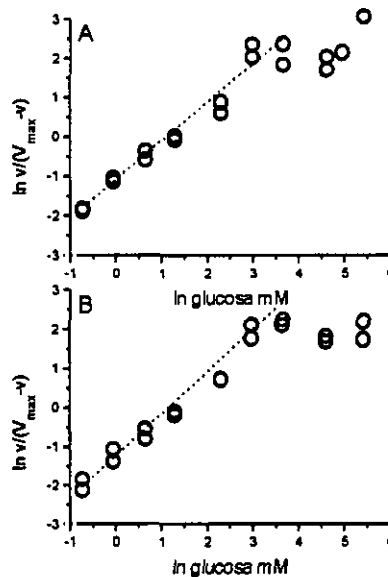
**Tabla XL.** Ajuste de la cinética de transporte de glucosa en células exponenciales crecidas en YP-glucosa 2% (p/v) a distintas ecuaciones<sup>1</sup>.

		cepa 3092				cepa SDM-1			
modelo		V <sub>max</sub>	Km	d	r <sup>2</sup>	V <sub>max</sub>	Km	d	r <sup>2</sup>
Directa simple		271±2.98	2.83±0.25	-	0.99	165±1.78	3.30±0.35	-	0.98
Eadie-Hofstee simple		271±7.58	2.73±0.17	-	0.94	162±2.19	3.09±0.41	-	0.92
Directa compleja	sist. 1	0.19±7.17	-0.92±0.99	-	0.94	18.2±1.95	0.01±0.02	-	0.97
	sist. 2	272±9.93	2.90±0.47	-		145±98.4	2.81±7.55	-	
Eadie-Hofstee compleja	sist. 1	-1.16±0.56	-0.57±9.21	-	0.98	6±10.9	0.003±0.01	-	0.98
	sist. 2	263±0.57	2.63±0.57	-		165±5.19	3.19±0.47	-	
Directa con difusión libre		288±13.1	3.27±0.48	-0.12±0.08	0.96	175±3.78	3.78±0.44	-0.07±0.04	0.98
Eadie-Hofstee con difusión libre		282±13.5	2.89±0.23	-0.09±0.09	0.94	275±42.7	1.51±0.77	0.74±0.46	0.55

<sup>1</sup> V<sub>max</sub> en nmol glucosa/(mg proteína·min); Km en mM; d en µl/min.



**Fig. 38.** Representación de Hill de los valores de actividad de transporte de glucosa en células crecidas en glicerol. **A** Cepa parental. **B** Cepa mutante. (Pte en fig-A=0.955, en la B=0.921).



**Fig. 39.** Representación de Hill de la actividad transportadora de glucosa en células crecidas en glucosa. **A** Cepa parental. **B** Cepa SDM-1. (Pte en fig. A= 0.965, en fig. B= 0.946).

**3.6.2.2. Cinéticas de transporte en condiciones de represión.** Cuando examinamos las características del transporte en células crecidas en glucosa como fuente represora, encontramos nuevas diferencias entre ambas cepas y respecto a los resultados descritos en las células crecidas en glicerol.

La cepa parental muestra una capacidad para transportar glucosa en estas condiciones que es inferior a la determinada en los cultivos con glicerol, aunque se mantengan en los mismos órdenes de magnitud. Este es un resultado similar al descrito en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se encontró que la capacidad máxima para transportar glucosa no depende del estado fisiológico de represión o desrepresión (Walsh y col., 1994a) (Fig. 37B).

Al estudiar los componentes del transporte en las células crecidas en glucosa, el de alta afinidad desaparece (Tabla XL), de acuerdo al carácter reprimible de este sistema. Aunque se puede modelizar un sistema con dos componentes, uno de ellos se ajusta con una  $K_m$  negativa, que carece de sentido fisiológico.

Otra vez, los ajustes que incluían el componente ajeno a la difusión facilitada o al transporte activo, sugirieron la improbabilidad de dicho componente en *Candida utilis*.

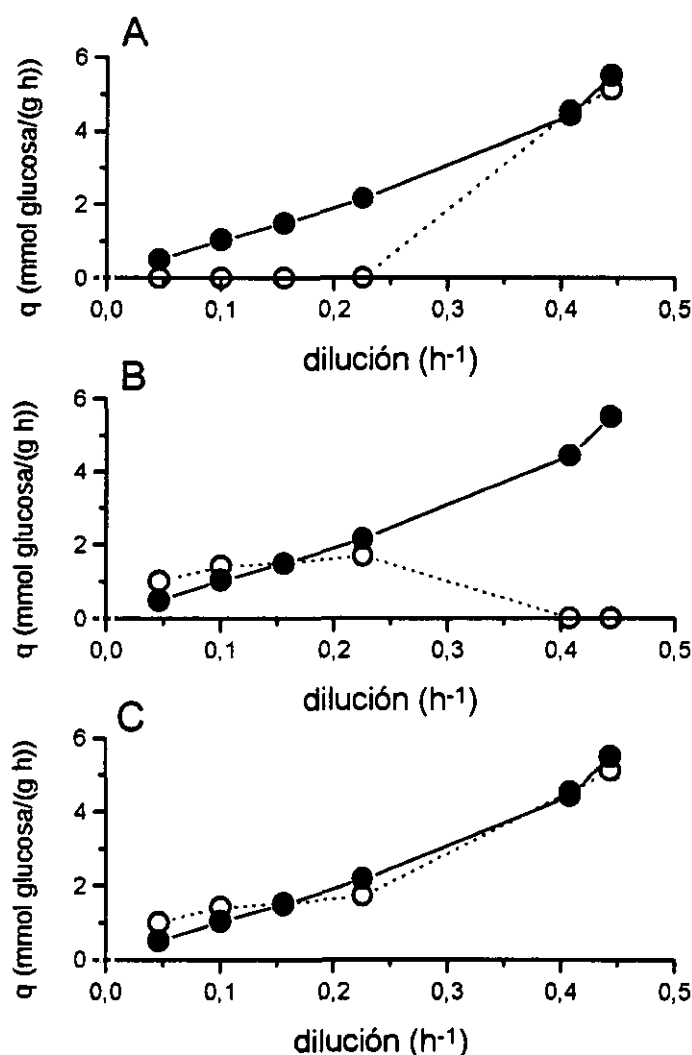
Nuestros resultados son distintos a los comunicados en anteriores trabajos con esta misma cepa, crecida en condiciones semejantes. Mientras que Peinado y col. (1989) muestran una figura en la que se puede distinguir dos componentes (fig. 6 de dicho trabajo), nosotros hemos obtenido una gráfica monofásica.

Los resultados conseguidos mediante la utilización de la técnica clásica de medida de transporte de azúcares concluyeron que, aparentemente, el transporte de glucosa en nuestra levadura estaba modulado por el propio sustrato. La base fisiológica de esta modulación fue atribuida a distintas razones: la existencia de distintos transportadores de difusión facilitada con diferentes  $K_m$  para el transporte (Postma y col., 1988) o regulación alostérica o de cooperatividad de un único sistema de transporte (Peinado y col., 1989). Nosotros no hemos encontrado que el transporte de glucosa sea modulado en la cepa de *Candida utilis* parental, a excepción del carácter reprimible del sistema de alta afinidad (Fig. 38 y 39). Ni la capacidad máxima de transporte, ni la afinidad global por la glucosa varían, independientemente de los factores ambientales en las que la célula ha crecido: en glicerol (ausencia de glucosa) o en glucosa. Es preciso discutir la razón de estas discrepancias.

Las técnicas clásicas fracasaron al intentar extrapolar las velocidades de transporte de glucosa determinadas en células desenergizadas o *in vivo* con las tasas de consumo de glucosa en células creciendo sobre glucosa en las mismas condiciones experimentales que las de la medida del transporte. Se observa una infravaloración de la capacidad de transporte cuando las condiciones experimentales imponían la presencia de cantidades significativas de glucosa libre en el medio (fig. 5 del trabajo de Postma y col., 1988).

Nosotros hemos realizado un abordaje similar al expuesto por Postma y col. (1988) para estimar la capacidad de transporte de glucosa *in situ* total y comparar los valores obtenidos con las tasas de consumo de glucosa calculadas en cultivos continuos sobre glucosa. Tomando los valores de glucosa residual en el fermentador y considerando que la cinética de transporte de glucosa obedece a un comportamiento básicamente michaeliano, se puede calcular los valores de velocidad de transporte *in situ* en *Candida utilis* 3092 (Fig. 40).

En las observaciones realizadas a bajas tasas de dilución, al aplicar los parámetros



**Fig. 40.** Relación entre la actividad de transporte y la tasa de consumo de glucosa en cultivo continuo de la cepa 3092<sup>1</sup>. **A** Cálculo de la tasa de consumo de glucosa a partir de las cinéticas de transporte de glucosa en células crecidas en medio YPD-glucosa. **B** Tasa de consumo por transporte activo de glucosa. **C** Suma de las tasas de consumo por difusión facilitada y transporte activo ( $C=A+B$ ). Símbolos: (○) Estimación de la tasa de consumo de glucosa calculada a partir de los datos de transporte. (●) Consumo real de glucosa en cultivo continuo  $q = \mu/Y$ .

<sup>1</sup> Los datos de consumo de glucosa a partir de las cinéticas de transporte en aquellas diluciones donde la cantidad de glucosa residual fue indetectable, se calculó suponiendo que la cantidad de glucosa residual real en el fermentador es, como máximo, igual a la cantidad de glucosa que se consume en 3 s (tiempo medio de muestreo).



deducidos de nuestros trabajos de transporte, no fuimos capaces de explicar ni la concentración residual de glucosa, ni la tasa de consumo. Estas pudieron predecirse considerando fundamentalmente el transporte activo de glucosa, estudiado por Peinado y col. (1989) en cultivos continuos. La razón se explica a continuación:

En nuestros experimentos sobre la cinética de transporte, las células utilizadas fueron recogidas de medios con altas concentraciones de glucosa. En estas condiciones, el transporte activo de glucosa se encuentra reprimido, de forma que resulta indetectable por métodos pHmétricos. Así, nosotros modelizamos las cinéticas de transporte mediada fundamentalmente por difusión facilitada en las células recogidas de los cultivos discontinuos con glucosa.

Sin embargo, en cultivos continuos con glucosa a bajas tasas de dilución, existe un importante componente de transporte activo, observación en la que coinciden tanto Postma y col. (1988) como Peinado y col. (1989). Se puede deducir, por tanto, que en las regiones de tasas de dilución donde la concentración de glucosa residual era menor de 10  $\mu\text{M}$ , nuestro modelo para calcular la tasa de consumo de glucosa a partir de los datos de transporte necesariamente no es válido.

Cuando se utilizaron las constantes cinéticas de transporte de glucosa global deducidas en la cepa parental crecida en glucosa, logramos predecir la tasa de consumo de glucosa en las regiones con un valor de tasa de dilución y la concentración de glucosa residual altas. Precisamente es en este rango de diluciones donde los datos obtenidos de Postma y col. (1988) y Peinado y col. (1989) no ofrecen resultados satisfactorios. De esta manera, podemos pesar que las velocidades de transporte instantáneo de glucosa son muy semejantes a las que se pudieran determinar en las fases de consumo estable de glucosa en esta cepa. Así se podrían descartar procesos de regulación en el transporte que fueran debido al estado de actividad metabólica. Otros sistemas de regulación se descartaron mediante la realización de los ajustes de Hill (Fig. 39A). La actividad de transporte resulta ser directamente dependiente de la concentración de glucosa en el ensayo, por lo que no es esperable fenómenos de cooperatividad, como se expuso en el apartado 3.6.2.2.

Deducimos que la técnica tradicional infravalora las velocidades de transporte cuando la concentración de glucosa externa es alta (en el rango de mM), tal como sería esperable según el análisis comparativo entre las técnicas clásicas y la modificación del grupo del Prof. van Dam (Walsh y col., 1994a). Esto explicaría por qué Peinado y col. (1989) determinaron una cinética de transporte bifásica en células de *Candida utilis* crecidas en glucosa en discontinuo. Nosotros medimos mayor velocidad de transporte en dichas condiciones y creemos que nuestros resultados se acercan más a la realidad que los estimados en trabajos anteriores al ser capaces de predecir las tasas de consumo de glucosa en medios con concentraciones de glucosa en el rango de mM.

Por tanto, es esperable que los valores obtenidos de células desenergizadas sean extrapolables a los que pueden mostrar las células cuando están creciendo en un medio con glucosa, por lo que las hipótesis aventuradas sobre la existencia *in vivo* de un componente de transporte de baja afinidad ( $K_m$  entre 70 mM y 1 M) no parecen reales. Estos resultados coinciden con otros previamente establecidos en *Saccharomyces cerevisiae*, que desechan la creencia establecida de un transporte de muy baja afinidad en esta levadura (Walsh y col., 1994a; Walsh y col., 1994b) y de otros determinados en el transporte de otros azúcares (Benito y Lagunas, 1992). Este fenómeno parece estar ligado a la metodología utilizada, pues es común cuando se utiliza las técnicas clásicas de medida de glucosa.

Con los datos obtenidos por nosotros, no podemos identificar si la responsabilidad del transporte por difusión facilitada de glucosa en *Candida utilis* crecida en glucosa recae en un único sistema o en un sistema complejo de transportadores cuya interacción se puede modelizar mediante un sistema de transporte con una única  $K_m$  aparente de alrededor de 2 mM. Sin embargo, se tienen pruebas de la existencia de varios transportadores funcionales en *Saccharomyces cerevisiae*. La regulación de la síntesis de distintos transportadores por la presencia de glucosa (Bisson y col., 1993; Özcan y col., 1993; Theodoris y col., 1994) en *Saccharomyces cerevisiae* explica por qué la afinidad del transporte de glucosa cambia dependiendo de la concentración externa del azúcar en esa levadura (Özcan y Johnston, 1995; Ciriacy y col., 1995; Reifemberger y col., 1995).

Podemos concluir, por lo tanto, que en la cepa parental existen dos sistemas de transporte, regulados de la siguiente manera:

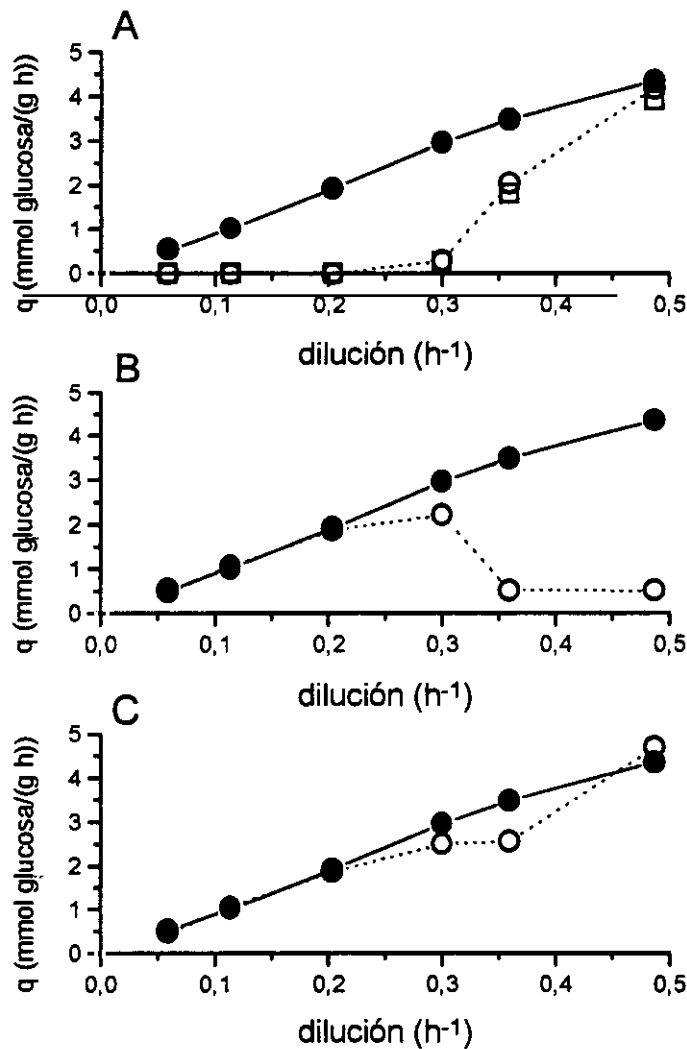
En cultivos crecidos en condiciones de desrepresión coexisten un transporte activo con una  $K_m$  aparente de 10-20  $\mu M$  y un componente de transporte de difusión facilitada con una  $K_m$  de alrededor de 2 mM. Este último componente es el que se conserva, con semejante afinidad aparente en cultivos realizados en condiciones de represión.

En los experimentos realizados con la cepa mutante, se encontraron resultados que la diferenciaban de la cepa parental (**Fig. 37B**). En primer lugar, la cepa SDM-1 fue capaz de duplicar la capacidad de transportar glucosa al compararla con células crecidas en ausencia de este azúcar. Este resultado puede sugerir que, en esta cepa, la capacidad para transportar glucosa puede estar modulada por la presencia del sustrato que se transporta. Al contrario que en la cepa parental, la modelización del transporte de glucosa en el mutante resultó en la caracterización, de nuevo, de un sistema de alta afinidad (con una  $K_m$  de, al menos, un orden de magnitud menor que el sistema de baja afinidad) (**Tabla XL**). Estos resultados son consistentes con los expuestos en el apartado 3.5.2.3. y 3.6.2.2., donde determinamos la persistencia del transporte activo en células crecidas en glucosa y la alta afinidad por glucosa a tasas de dilución bajas en cultivos continuos.

La posibilidad de la existencia de difusión pasiva en el mutante (apuntada en el apartado anterior) se descarta, pues este componente debería aparecer en todas los ensayos de transporte, con independencia de los estados fisiológicos en el que se encontraban las células cuando fueron recogidas. De esta manera, nuestras conclusiones para ambas levaduras estudiadas, se alinean con las de aquellos trabajos que sostienen la ausencia de estos tipos de transporte de azúcares en levaduras y microorganismos en general realizados mediante distintos abordajes experimentales (Lengeler, 1993; Walsh y col., 1994a; Walsh y col., 1994b; Reifemberger y col., 1995; Gamo y col., 1995; Coons y col., 1995).

Cuando intentamos ensayar el grado de fiabilidad de la determinación del transporte de glucosa, mediante la comparación de los valores de transporte predecibles con las tasas de consumo de glucosa en cultivos continuos, utilizando las mismas consideraciones que las descritas en la cepa parental, observamos los siguientes resultados (**Fig. 41**):

Como sucedía con la cepa parental, las tasas de consumo calculadas a partir de la cinética de transporte correspondientes a las tasas de dilución más bajas, resultaron ser muy inferiores a las reales. Mientras que en la cepa parental, los estudios cinéticos del transporte de glucosa en células crecidas en glucosa, no consideraban la tasas de transporte activo reprimido, en el mutante sí existe este transporte. En principio, este componente debería explicar las tasas de consumo de glucosa a  $D$  bajas. Sin embargo, la actividad registrada



**Fig. 41.** Cálculo de las tasas de consumo de glucosa en cultivo continuo con glucosa de la cepa SDM-1, a partir de la cinética de transporte de glucosa obtenidos de células crecidas en medio YPD-glucosa<sup>1</sup>. **A** Datos de consumo calculados a partir de los datos de la cinética de transporte. **B** Consumo de glucosa calculado por transporte activo de glucosa en muestras procedentes del fermentador. **C** Suma de las tasas de consumo procedentes del transporte de glucosa por difusión facilitada y transporte activo. Símbolos: (○) Datos teóricos de consumo calculados por las actividades de transporte. (□) Transporte de glucosa debida únicamente a difusión facilitada, tras descontar el componente de transporte activo de las cinéticas de transporte instantáneo de glucosa. (●) Consumo real de glucosa.

<sup>1</sup> Cuando la cantidad residual de glucosa fue indetectable en el fermentador, los cálculos para deducir las tasas de consumo del azúcar se realizaron como en la fig. 40.

en cultivos discontinuos con glucosa es muy inferior a la que hemos determinado en cultivo continuo. Esto reafirma la observación de que, aunque la cepa SDM-1 mantiene cierta capacidad de transporte activo de glucosa, éste es parcialmente reprimible por altas concentraciones del azúcar en el medio. Son las actividades de transporte activo determinadas en muestras extraídas del fermentador las que son capaces de suministrar el flujo de glucosa que se consume a tasas bajas de D en SDM-1. Además, parece plausible que la modulación aparente de la capacidad máxima de toma de glucosa mediante algún mecanismo dependiente de la concentración de glucosa externa descrita en el mutante, puedan explicar el fracaso de la extrapolación de las cinéticas de transporte con las tasas de consumo a bajas tasas de dilución. Ya hemos mostrado que la  $V_{max}$  de transporte de glucosa en células crecidas en glicerol (es decir, en ausencia de glucosa) es la mitad que la mostrada en células crecidas en presencia de glucosa. En cultivos continuos con glucosa como fuente de carbono, se puede reproducir la situación de ausencia-presencia de glucosa.

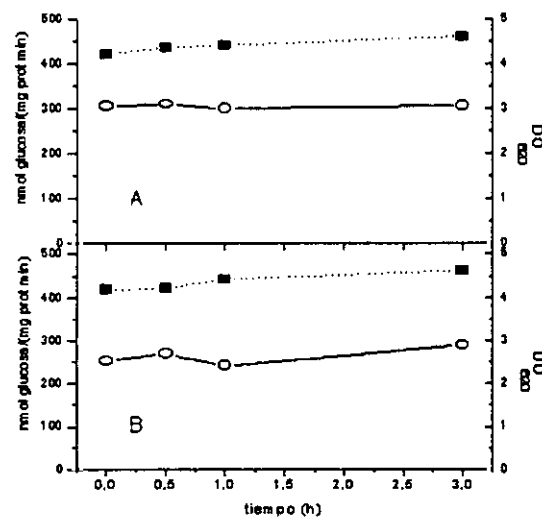
Sólo cuando la concentración de glucosa residual en el fermentador fue alta, las cinéticas de transporte calculadas en la cepa SDM-1 pudieron explicar las tasas de consumo de glucosa, pues la vía fundamental para la entrada de glucosa dentro de la célula es la difusión facilitada.

Como en el caso de la cepa parental, los datos de transporte tomados *in vitro* son válidos para estimar las tasas de consumo de glucosa en condiciones fisiológicas estables. Recientemente, se ha descrito que las determinaciones de la tasa de transporte en *Saccharomyces cerevisiae* mediante métodos radiactivos, no eran útiles para predecir la tasa de consumo *in vivo*, al menos durante estados de consumo transitorios, por la existencia de un efecto inhibitorio de la glucosa-6-P (Rizzi y col., 1996). Esta hipótesis rescata antiguas observaciones de Kotyk y Kleinzeller (1967), Azam y Kotyk (1969) y Sols (1967) y utilizadas para elaborar modelos de consumo de azúcares (Galazzo y Bailey, 1990; Grosz y Stephanopoulos, 1990), aunque fueron discutidas posteriormente por Perea y Gancedo (1979). No parece, por tanto, que esto sea lo que ocurre en *Candida utilis*, como hemos demostrado aquí. Por otro lado, existen referencias bibliográficas, que indican que las tasas de consumo de glucosa pueden llegar a 13.8 mmol/(g·h) (van Urk y col., 1989), en experimentos de pulso de altas concentraciones de glucosa en cultivos continuos estables. Este valor de toma de glucosa está en el mismo orden de magnitud que la actividad transportadora de glucosa en la cepa parental que hemos determinado experimentalmente, por lo que no esperaríamos tampoco que la acumulación de glucosa-6-P en células metabólicamente activos pudiera intervenir en la tasa de transporte de glucosa.

Como conclusión de los análisis realizados en este apartado, la cepa SDM-1, parece que muestra una actividad total de toma de glucosa, cuya capacidad, aunque no la afinidad, parece depender de la fuente de carbono consumida por la células. Esta resulta ser una diferencia fundamental respecto a las conclusiones obtenidas en la cepa parental 3092.

**3.6.2.3. Dependencia de la actividad de transporte de glucosa por factores ambientales en la cepa SDM-1.** Afrontamos el estudio, con mayor profundidad, del carácter modulable del transporte de glucosa en el mutante, que junto a la menor capacidad de transporte fueron las diferencias más importantes encontradas al comparar esta actividad con la de la cepa parental.

Realizamos estudios sobre el tiempo necesario para procurar un incremento en las capacidades de transporte de glucosa, cuando la cepa SDM-1 se trasladaba de un medio con fuente de carbono no fermentable a glucosa, y viceversa. Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 42.



**Fig. 42.** Evolución de la capacidad máxima de transporte de glucosa (concentración de glucosa 100 mM en los ensayos de transporte), durante las primeras horas después de transferir biomasa (DO = 4) de medios con glicerol a medios con glucosa y viceversa. **A** Transferencia a medio con glucosa 2% (p/v). **B** Células crecidas en medio con glucosa se reinocularon a medios con glicerol. Símbolos: (■) Biomasa. (○) Capacidad de transporte.

Durante los tiempos de experimentación no apreciamos un cambio de las capacidades máximas de transporte con concentraciones saturantes de glucosa. Estos resultados indican que no parece posible que los mecanismos que mediaran en el incremento de la capacidad de transporte fueran por regulación de los transportadores preexistentes antes del cambio de fuente de carbono. Los procesos de inhibición, inactivación, modulación por cooperativismo, alosterismo, etc. se manifiestan durante tiempos de experimentación más cortos que los utilizados por nosotros. Esto indicaría que el mecanismo más probable implicado en la modulación de la velocidad máxima de transporte de glucosa estaría mediado por síntesis de proteína.

Nos planteamos la influencia del flujo metabólico en las cinéticas de toma de glucosa de mutante SDM-1. Describimos en el apartado 3.5.3.3. cómo la afinidad por la glucosa parecía depender de la presencia de fuentes de carbono alternativas que sustentaran el crecimiento. Entonces, las células con una capacidad de consumo de azúcares saturada

eran capaces de modular la afinidad o/y la tasa de consumo de glucosa y nos preguntábamos por la influencia del transporte de glucosa en el fenómeno.

Se ha comunicado que la utilización de técnicas de medida de transporte de glucosa que precisan un ensayo de alrededor de 5 segundos, pueden arrojar conclusiones erróneas respecto a la capacidad máxima de transporte de glucosa en células afectadas en la capacidad para metabolizar glucosa (Walsh y col., 1994b; Walsh y col., 1994c). Si el mutante tuviera defectos serios que impidieran el consumo rápido de glucosa cuando las muestras fueran extraídas de medios con glicerol, entonces podríamos explicar la modulación aparente del transporte de glucosa en dependencia con el sustrato de origen de las levaduras.

Gancedo y col. (1967) comunicaron que la actividad de consumo de glucosa en *Candida utilis* puede estar muy limitada en muestras precrecidas en medios con una fuente de carbono oxidable, por el bajo nivel de actividad piruvato quinasa. Esto indicaría que el descenso de actividad de transporte de glucosa en células procedentes de glicerol pudiera deberse a una incapacidad para consumirla.

Para confirmar la hipótesis que relaciona una baja capacidad de consumo con baja velocidad de transporte aparente, realizamos cultivos del mutante en presencia del análogo de glucosa 2-desoxiglucosa. En este caso, los valores de consumo de glucosa que se pueden determinar en células desenergizadas procedentes de estos cultivos fueron muy inferiores a los que se hallaron en los experimentos control:

En células procedentes de glucosa se puede conseguir tasas de consumo de 113 nmol/(mg prot·h), mientras que en células que estuvieron creciendo en presencia de 2-DOG se alcanzaron tasas de consumo de  $67 \pm 2.35$  nmol/(mg prot·h); es decir se redujo la capacidad de consumo en un 40%. Cuando las células desenergizadas procedían de cultivos con glicerol, entonces los valores de consumo fueron cercanos a 85 nmol glucosa/(mg prot·h). Sin embargo, en células crecidas en medios con glicerol y 2-desoxiglucosa, este valor se redujo a  $51 \pm 5.68$  unidades (reducción respecto al control de un 40%).

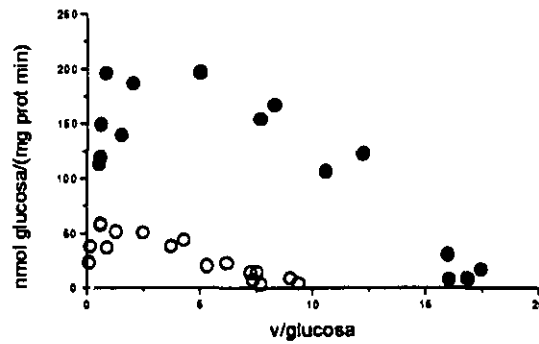
La reducción de la actividad de consumo del azúcar pudo deberse a la aparición de la actividad fosfatasa de hexosas-fosfato que ya hemos descrito y/o a otros efectos paralelos en el metabolismo de las levaduras por 2-DOG que se han descrito (ver Gancedo y Serrano, 1989).

De esta manera, tuvimos un sistema con el que pudimos controlar la capacidad metabólica de la levadura.

Los resultados obtenidos de las cinéticas de transporte de glucosa en la cepa SDM-1 en células crecidas en medios con 2-desoxiglucosa, se muestran en las Fig. 43. Los parámetros de transporte se muestran en la Tabla XLI. Mientras que los valores de  $K_m$  aparente no resultaban estar muy afectados por el análogo del glucosa, la  $V_{max}$  se encontró disminuida en las células procedentes de medios con 2-DOG-glicerol. Sin embargo, la  $V_{max}$  conseguida en muestras procedentes de medios con glucosa y 2-DOG, fue semejante a la que se consiguió en los experimentos control sin el análogo (ver tabla XL).

Si el mutante no pudiera metabolizar la glucosa transportada, entonces el azúcar transportado y no metabolizado se acumulara en el interior celular. Hemos descrito que existe un componente importante de difusión facilitada en el transporte de glucosa. Ateniéndonos al concepto de difusión, la acumulación del sustrato disminuiría el gradiente

Resultados y discusión



**Fig. 43.** Transporte instantáneo en la cepa SDM-1 crecida en medios donde estaba presente 2-desoxiglucosa al 0.2% (p/v). Símbolos: (●) Resultados de muestras procedentes de cultivos en medios YPD-glucosa (2%). (○) Resultados de células procedentes de medios YPD-glicerol (2%).

**Tabla XLII.** Parámetros cinéticos del transporte de glucosa en la cepa SDM-1 crecida en medios con 2-desoxiglucosa.

Modelo	componente 1			componente 2		
	Vmax	Km (mM)	r <sup>2</sup>	Vmax	Km (mM)	r <sup>2</sup>
medio glucosa-desoxiglucosa						
Eadie-Hofstee						
directo	176±14	8.5±1.7	0.76			
compuesto	163±12	5.7±3.2		-7.8±1.9	1.2±0.3	0.88
Michaelis-Menten						
directo	175±15	8.2±1.5	0.78			
compuesto	164±15	5.9±2.1		-5.7±2.1	1.3±0.5	0.89
medio glicerol-desoxiglucosa						
Eadie-Hofstee						
directo	49±6.2	4.3±0.9	0.66			
compuesto	67±6.3	7.0±0.9		-16.±4.2	1.8±	0.90
Michaelis-Menten						
directo	47±4.5	4.2±0.8	0.68			
compuesto	68±7.5	7.5±0.1		-15±3.8	1.7±0.2	0.92

de concentración entre el exterior y el interior celular, provocando un descenso de los valores aparentes de transporte.

Pudimos concluir que no era directa la relación entre una reducción de la capacidad de consumo de glucosa y el descenso de la tasa aparente de transporte, pues, aunque esto sucedía en los experimentos con células crecidas en glicerol, no pudimos confirmar la hipótesis en células tomadas de medios con glucosa.

Por otro lado, contrariamente a lo consignado por Gancedo y col. (1967), *Candida utilis*, aunque no inicia un crecimiento inmediatamente después de que la levadura haya sido transferida de un medio con fuentes de carbono oxidables a otro con glucosa (ver Fig. 42), no indica que sea incapaz de metabolizar la glucosa del medio. Existe la objeción de que los niveles de piruvato quinasa puedan ser altos en cultivos con glicerol. Este sustrato ingresa en el flujo metabólico en forma de DHAP, de forma que parte del glicerol consumido requiere el paso de la piruvato quinasa para ser oxidado. Sin embargo, experimentos adicionales con etanol, mostraron que la levadura es capaz de consumir glucosa incluso en células procedentes de cultivos con etanol, cuyo circuito de hidrólisis no precisa, en principio, de una gran actividad piruvato quinasa (Fig. 45). Este asunto será discutido más profusamente en el apartado siguiente.

**3.6.2.4 Relación del transporte con el control del consumo de glucosa.** Ya hemos comentado que los datos de toma de glucosa se ajustaron a las tasas de consumo reales de glucosa en cultivos continuos de glucosa en la cepa parental. Sin embargo, los valores de  $V_{max}$  de transporte exceden significativamente los valores máximos de consumo de glucosa en las dos cepas utilizadas, cualquiera que sea la forma en que se cultivaron, continuo o discontinuo.

Fue necesario el estudio de la capacidad de consumo de glucosa con el fin de enfrentarlas a la del transporte. A su vez, este estudio nos permitiría confirmar si la razón hipotética de la desrepresión en el mutante es la escasa capacidad de transportar glucosa.

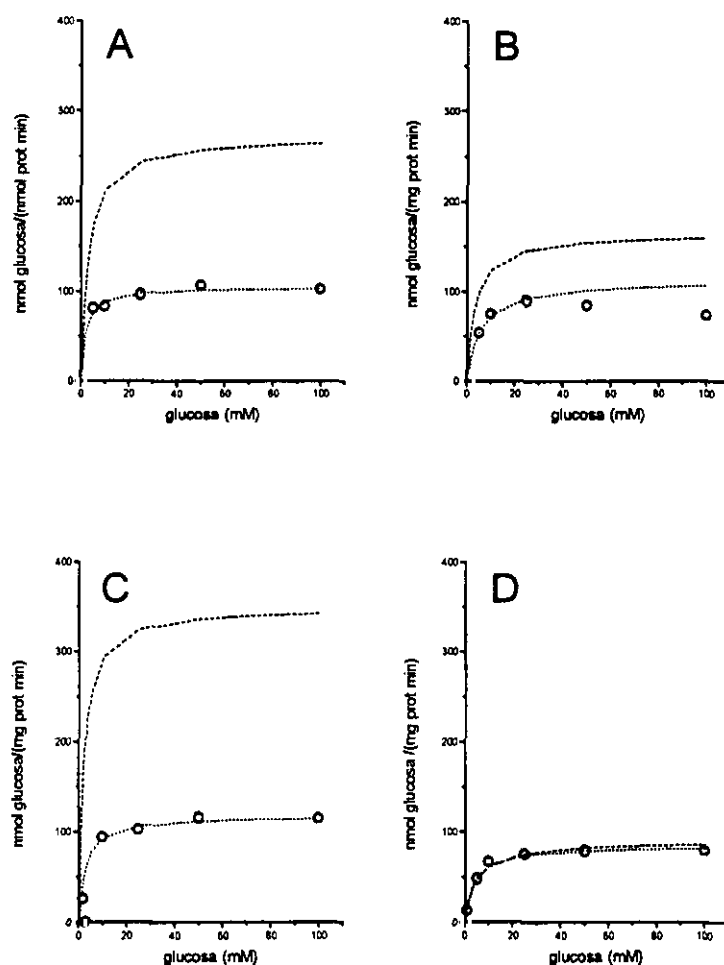
Obtuvimos levaduras desenergizadas recolectadas en las mismas condiciones que las utilizadas para la medida del transporte de glucosa. Ensayamos entonces la capacidad para consumir distintas concentraciones de glucosa.

Los resultados se muestran en las Fig. 46. Los análisis de las constantes cinéticas para el consumo de glucosa por células desenergizadas, se muestran en la Tabla XLII.

Aunque en los cálculos realizados de las constantes cinéticas de consumo de glucosa, se asumían comportamientos michaelianos, esto no siempre ocurría así. En los ensayos de consumo con altas concentraciones de glucosa, se observó eventualmente que la velocidad del consumo descendía ligeramente en comparación con experimentos realizados con concentraciones inferiores de glucosa.

De cualquier manera, se puede comprobar como la afinidad del consumo de glucosa es semejante a los valores de  $K_m$  deducidos de la capacidad total de transporte. La cepa parental muestra una afinidad ligeramente mayor que el mutante, independientemente de la fuente de crecimiento. Otra vez, encontramos que las levaduras fueron capaces de consumir glucosa, incluso cuando las células utilizadas en el ensayo procedían de medios con fuentes de carbono no fermentables, en contraposición a los datos ofrecidos por Gancedo y col. (1967). Incluso la capacidad máxima para consumir glucosa no depende de la fuente de carbono que sustentó el crecimiento de las levaduras. Estos resultados indicaron que las vías glucolíticas en *Candida utilis* no parecen estar sujetas a los mismos





**Fig. 46.** Cinéticas de consumo de glucosa en células desenergizadas. Comparación con las tasas esperadas por transporte de glucosa. **A** Cepa 3092 precrecida en glucosa 2% (p/v). **B** Cepa SDM-1 procedente de medio con glucosa 2% (p/v). **C** Cepa parental tomada de medio con glicerol 2% (p/v). **D** Cepa mutante crecida en medio con glicerol 2% (p/v). Símbolos: (○) Datos experimentales de consumo de glucosa. La línea discontinua representa la evolución del consumo según la concentración de glucosa en una cinética de saturación a partir de los datos reales. La línea punteada representa la tasa teórica de consumo a partir de los valores de las cinéticas de transporte.

tipos de regulaciones que las que se aprecian en *Saccharomyces cerevisiae*, en dependencia de la naturaleza oxidativa o fermentable de la fuente de carbono. De esta manera, las cinéticas que mostraron una reducida actividad de transporte en el mutante en cultivos con glicerol no podrían explicarse por la incapacidad para metabolizar glucosa como podría sugerir el trabajo de Walsh y col. (1994b y 1994c).

**Tabla XLII.** Constantes cinéticas para el consumo de glucosa en células desenergizadas procedentes de la fase exponencial de cultivos con distintas fuentes de carbono<sup>1</sup>.

recolectadas de medios con	3092		SDM-1	
	Ks	qmax	Ks	qmax
glucosa	1.84±0.21	105±0.55	5.43±0.64	113±1.24
glicerol	2.64±0.02	117±1.23	4.55±0.32	84.5±0.96

<sup>1</sup> Unidades de afinidad en mM. Unidades de tasa de consumo en nmol glucosa/(mg prot·min). Las concentraciones iniciales de las fuentes de carbono en los medios de crecimiento fueron de 2% (p/v). En los cálculos cinéticos se asume que el consumo de glucosa sigue una cinética michaeliana en relación a la concentración de glucosa. Los valores de las tasas se calculan una vez que se alcanzan las fases de consumo estables tras la adición de glucosa a las suspensiones celulares.

Otra de las características encontradas, es que la velocidad máxima con que nuestras levaduras son capaces de metabolizar glucosa resultó ser claramente inferior a la capacidad máxima de transportar el azúcar, con la excepción de los ensayos con el mutante procedente de cultivos con glicerol, donde ambas actividades son semejantes. Aparentemente, la actividad instantánea para transportar glucosa se encuentra en exceso respecto a la capacidad para consumirla, especialmente en cultivos realizados con glucosa como fuente de carbono.

Este resultado indicaría que aunque la tasa de transporte de glucosa en el mutante fuera inferior a la hallada en la cepa parental, sin embargo no parecería la causa de la desrepresión, pues el mutante sería capaz de mantener unos flujos metabólicos semejantes a la parental. Este resultado resulta consistente a los datos ofrecidos en los estudios de las tasas metabólicas realizados en cultivos en discontinuo con una variedad de fuentes de carbono.

Los análisis de los resultados obtenidos en nuestra cepa parental sugirieron que la actividad transportadora de glucosa es semejante en células desenergizadas y en células con altos flujos metabólicos. Se puede suponer que, durante un consumo estable de glucosa, la cantidad de glucosa transportada neta es semejante a la metabolizada, pues la actividad de los pasos implicados en las rutas de consumo de un sustrato son iguales a la del flujo total en sistemas estacionarios, siempre que no exista la acumulación de algún metabolito intermediario (Kacser, 1989; Westernhoff, 1989; Fell, 1992). Nos preguntamos cómo la levadura puede compatibilizar un hipotético exceso de transporte con flujos metabólicos más reducidos. Pueden plantearse distintas opciones:

► La velocidad de transporte de glucosa inicial no es igual que la que se pudiera encontrar en células con crecimientos estables. Los análisis de los resultados con ambas cepas en trabajos con cultivos continuos descartan esta explicación. Aunque ya se ha propuesto una posible modulación del transporte en condiciones de consumo estable, comparada con el transporte inicialde, recientemente, se ha propuesto que la actividad de transporte en *Saccharomyces cerevisiae* se inhibe por la acumulación de glucosa-6-fosfato (Rizzi y col., 1996).

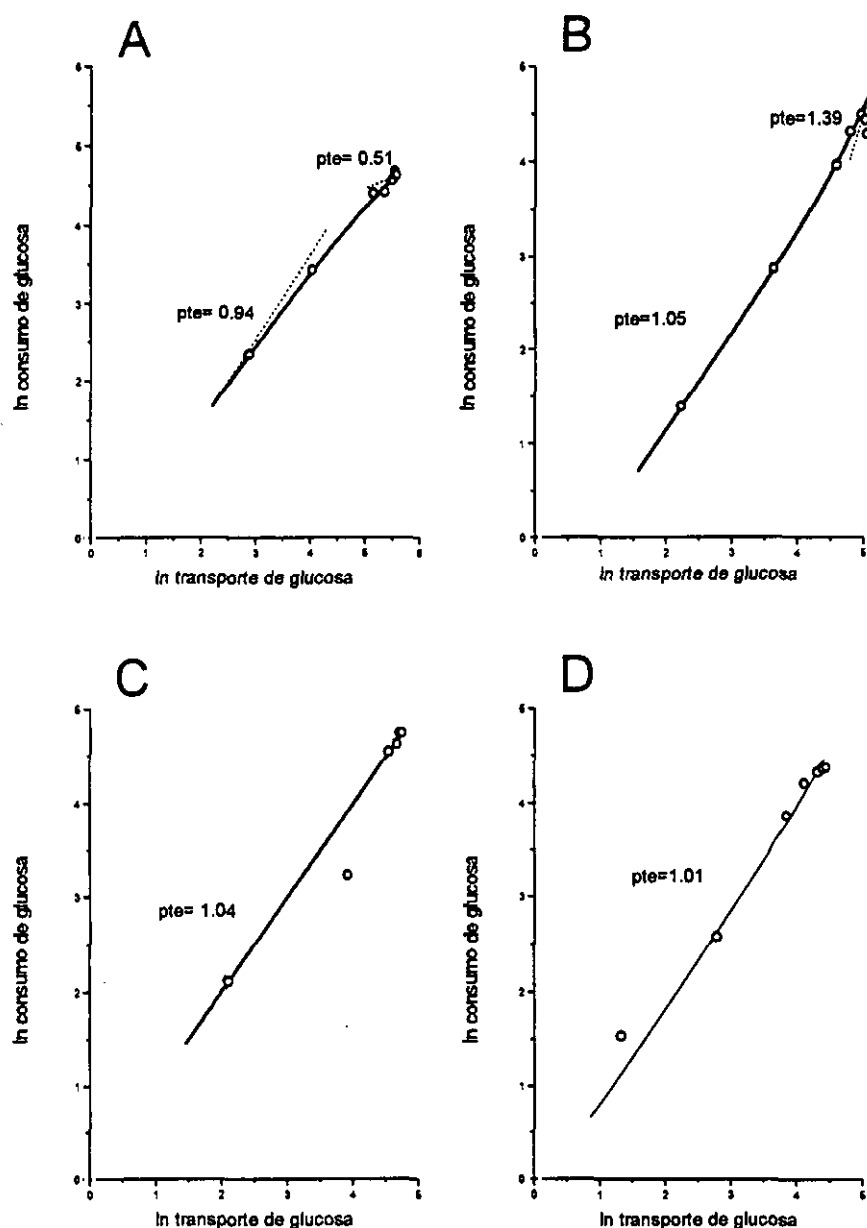
► La única posibilidad racional, para ambas cepas, es que la levadura acumule altas cantidades de glucosa libre en la célula cuando la concentración de azúcar externa sea alta. Hasta ahora se ha propugnado que la concentración de glucosa libre en el interior de las levaduras tiende a ser muy baja (Gancedo y Serrano, 1989). Sin embargo, la posibilidad de la existencia de altas concentraciones de glucosa libre en determinadas situaciones dentro de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido deducida recientemente (van Dam, comunicación personal). Nosotros hemos intentado determinar la cantidad de glucosa libre en células desenergizadas utilizando los métodos para la determinación de metabolitos propuesta por el grupo del Prof. van Dam (de Koning y van Dam, 1992). Sin embargo, los resultados alcanzados no fueron concluyentes e indicaron que sería preciso la modificación del protocolo o la utilización de otro tipo de técnicas experimentales para calcular la glucosa libre intracelular (datos no mostrados).

Nos hemos preguntado por el papel del transporte en la regulación del consumo de glucosa. Ya hemos determinado que en los experimentos con la técnica de cultivos continuos, podemos extrapolar la tasa de consumo de glucosa en condiciones estables con la velocidad de transporte instantáneo. Sin embargo el rango de concentraciones de glucosa libre en el medio no excedía de 15 mM y nosotros hemos ensayado para los experimentos mostrados en este apartado concentraciones de glucosa sensiblemente mayores.

Con este fin hicimos estudios de buscando la relación de cómo se afectaba la tasa metabólica cuando la velocidad de transporte de glucosa se incrementaba fraccionalmente. Para ello, utilizamos una aproximación semejante a la desarrollada en la Teoría del Análisis del Control Metabólico (como revisión, ver Fell, 1992).

Los resultados se encuentran en las Fig. 47. Como era esperable, cuando la concentración de glucosa inicial era menor o parecida a la  $K_m$  para el transporte de glucosa, cualquier incremento en la tasa de transporte de glucosa teórico, implicaba un aumento similar en la velocidad con que la glucosa era consumida por las células. Este dato está en consonancia con aquellos que indicaban el papel ejercido por el paso de transporte en el control de la velocidad del metabolismo de fuentes fermentables en levaduras (van Uden, 1967; Lagunas y col., 1982; Osinga y col., 1988; Osinga y col., 1989; Gancedo y Serrano, 1989; Weusthuis y col., 1994b) y con los resultados que permitieron el cálculo de la tasa de la consumo de glucosa gracias a las constantes de transporte total de glucosa. Encontramos que esto sucedía a lo largo de todo el rango de concentraciones de glucosa cuando se utilizó glicerol para crecer la cepa mutante. Aparentemente, en este caso, la influencia ejercida por el transporte en este cepa se mantenía con independencia de la concentración externa de glucosa.

Sin embargo cuando las concentraciones de glucosa externa, en el caso de la cepa parental, fueron muy superiores a las  $K_m$  de transporte, la influencia del transporte en la



**Fig. 47.** Variaciones de la capacidad de consumo de glucosa en relación a los incrementos de la velocidad de transporte (evolución según los ajustes de los datos experimentales de consumo y transporte). **A** Cepa 3092 crecida en glucosa. **B** Cepa SDM-1 crecida en glucosa. **C** Cepa parental crecida en glicerol. **D** Cepa mutante crecida en glicerol. Los círculos vacíos representan los valores reales de consumo.

tasa de consumo de glucosa, en general disminuían. Esto indicaría que la pieza fundamental que determinara la velocidad del metabolismo de glucosa se desplazaría desde el paso de transporte a otro posterior. Este resultado resulta ser una diferencia respecto a lo encontrado en *Saccharomyces cerevisiae*, donde la capacidad total de transporte se sitúa en niveles semejantes a las tasas máximas de transporte (Lagunas y col., 1982; Gancedo y Serrano, 1989; Walsh y col., 1994a).

No solamente se puede determinar la pérdida de control de la importancia del paso del transporte en el metabolismo de glucosa mediante el comportamiento ideal del metabolismo a lo largo de todas las concentraciones de glucosa ensayadas. También los resultados que ofrecieron la medida del metabolismo real en células desenergizadas expuestas a altas concentraciones de glucosa, reforzaron esta conclusión. En estas condiciones, apreciamos un descenso de las tasas de consumo de glucosa respecto a los valores observados en los ensayos con menores concentraciones de glucosa (Fig. 47). La explicación de este fenómeno pudiera encontrarse en la aparición de fenómenos de estrés osmótico a altas concentraciones de glucosa, que pudiera afectar el flujo de consumo de glucosa en estas concentraciones, a desacoples metabólicos -p. ej. si parte de la población estudiada fuera incapaz de recargar los bajos niveles de ATP que se predicen en microorganismos tras la adición de pulsos de glucosa (Nielsen y col., 1991) y que se observan en levaduras (de Koning y van Dam, 1992)- o a efectos no conocidos por nosotros de los denominados por Fiechter y Sonnleitner (1995) como sobreflujo metabólico ocurridos a altas concentraciones de sustrato.

Nuestros resultados estarían indicando que, aunque efectivamente la tasa de transporte de glucosa es superior a la máxima capacidad celular para metabolizar el sustrato, el control realizado por el paso de transporte en el consumo de glucosa sería definitivo siempre que las concentraciones de glucosa en el medio se situaran por debajo o en torno a la  $K_m$  de transporte. De esta manera parece insuficiente las conclusiones ofrecidas por van den Broek y col. (1987) donde, tan sólo por la constatación de que las  $K_s$  del consumo de un azúcar y la  $K_m$  aparente de transporte de éste son semejantes, se deduce que el transporte del azúcar es el que define la velocidad de un flujo.

Ya hemos encontrado en la bibliografía datos que indican el la capacidad de consumo de otras fuentes de carbono pueda ser teóricamente superior a la velocidad de consumo, al menos en el caso de la sacarosa y *Debaryomyces yamadae* (Kaliterna y col., 1995), sin embargo, esta es la primera vez, hasta donde nosotros sabemos, que se describe este fenómeno respecto al transporte de glucosa en levaduras.

Los resultados expuestos indicaban que las diferencias encontradas en la capacidad para transportar glucosa entre la cepa parental y la mutante, no eran suficientes para provocar diferencias en la tasa metabólica entre ambas cepas. Este resultado está de acuerdo a las conclusiones ofrecidas en ciertos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, cuando tras aumentar la velocidad de transporte de glucosa mediante la manipulación del número de transportadores no se conseguía restaurar la represión catabólica en levaduras con la mutación HTR1, con baja tasa de transporte de glucosa (Özcan y col., 1993). Aunque, la relación entre represión catabólica y alta capacidad de transporte no está suficientemente clara en *Saccharomyces cerevisiae*, ya que los mutantes pleiotrópico *grr1* (Entian y Zimmermann, 1980; Bailey y Woodward, 1984; Flick y Johnston, 1991; Conklin y col. 1993; Özcan y col., 1994), con circuitos de represión defectuosos, son capaces de eliminar el fenotipo desreprimido y la baja capacidad de transporte de glucosa, mediante

el supresor *rgt1* cuyo efecto fisiológico es la recuperación de la alta capacidad de transporte (Bisson y Carlson, 1994).

### 3.6.3. Niveles de metabolitos glucolíticos y actividad metabólica en estados de consumo transitorios.

Los resultados comentados en el apartado 3.6.2. indicaron que la razón aparente de la desrepresión de la cepa SDM-1 no debería buscarse en una actividad transportadora deficiente. Sin embargo, hasta ahora hemos buscado la causa de la desrepresión en el mutante SDM-1 utilizando métodos que imponían el estudio del metabolismo en las fases estables del consumo de fuentes de carbono. Sin embargo, en los últimos años, se ha señalado la importancia de estudiar el comportamiento de las levaduras antes de que la actividad metabólica alcance un flujo estable. Estas situaciones han recibido la denominación en inglés de *transient states*, que dan idea de los sucesos metabólicos que ocurren en los microorganismos desde que se les aporta un sustrato hasta que los microorganismo logran alcanzar flujos estacionarios y continuos en el tiempo. Diferentes estudios señalan que en estas fases ocurren una serie de fenómenos que pueden marcar el funcionamiento de las levaduras durante las fases de consumo estable de un sustrato. Alguno de ellos, han sido conocidos y estudiados desde hace tiempo: El grupo del Prof. Thevelein (Thevelein, 1992; Becher-dos Passos y col., 1992; y como revisión, ver Thevelein, 1994 y Thevelein y Hohmann, 1995) ha mostrado que al añadir glucosa y otras fuentes de carbono fermentables en células desenergizadas de *Saccharomyces cerevisiae* se producen picos temporales de AMPc. La acumulación de este intermediario de señal desencadena distintas respuestas en la levadura que afectan a su capacidad para consumir fuentes de carbono, fundamentalmente en las transiciones entre el consumo de fuentes de carbono gluconeogénicas a glucolíticas. Recientemente, se ha propuesto que la señal de AMPc no solo estaría implicada en respuestas a corto plazo en levaduras, sino que también estaría relacionada con el mantenimiento de la síntesis enzimática a largo plazo en cultivos con glucosa (Boy-Marcotte y col., 1996). Además, se ha determinado que la síntesis de determinadas enzimas de la glucólisis dependen de la acumulación de determinados metabolitos, tras el inicio del consumo de glucosa, en *Saccharomyces* (Maitra y Lobo, 1971; Boles y col., 1993a; Boles y col., 1993b; Müller y col., 1995; Boles y col., 1996). Comprueban como para la inducción de la síntesis de la fructosa-6-fosfato quinasa y para el gen de la enolasa II es necesario la acumulación de glucosa-6-fosfato, mientras que para la inducción de la piruvato quinasa, se requiere, al menos un funcionamiento metabólico hasta la producción de fructosa-6-fosfato. Sin embargo, la piruvato descarboxilasa se induce levemente por la acumulación de metabolitos hexosa-fosfato y, en mucho mayor grado, por la acumulación de triosas-fosfato. También la inducción de la síntesis de la alcohol deshidrogenasa I se necesita la presencia de las triosas-fosfato.

Además, un cambio repentino de la concentración de la fuente de carbono en *Saccharomyces cerevisiae* puede ocasionar otros efectos fisiológicos ampliamente conocidos. Entre ellos, pueden citarse el cambio del metabolismo respiratorio al fermentativo si la concentración de cualquier fuente susceptible de ser fermentada es suficientemente alta como para que el flujo metabólico exceda la capacidad respiratoria, según explica la hipótesis de la capacidad respiratoria limitada (Barford y Hall, 1981; Fiechter y col., 1981; Petrik y col., 1983; Rieger y col., 1983; van Dijken y Scheffers;

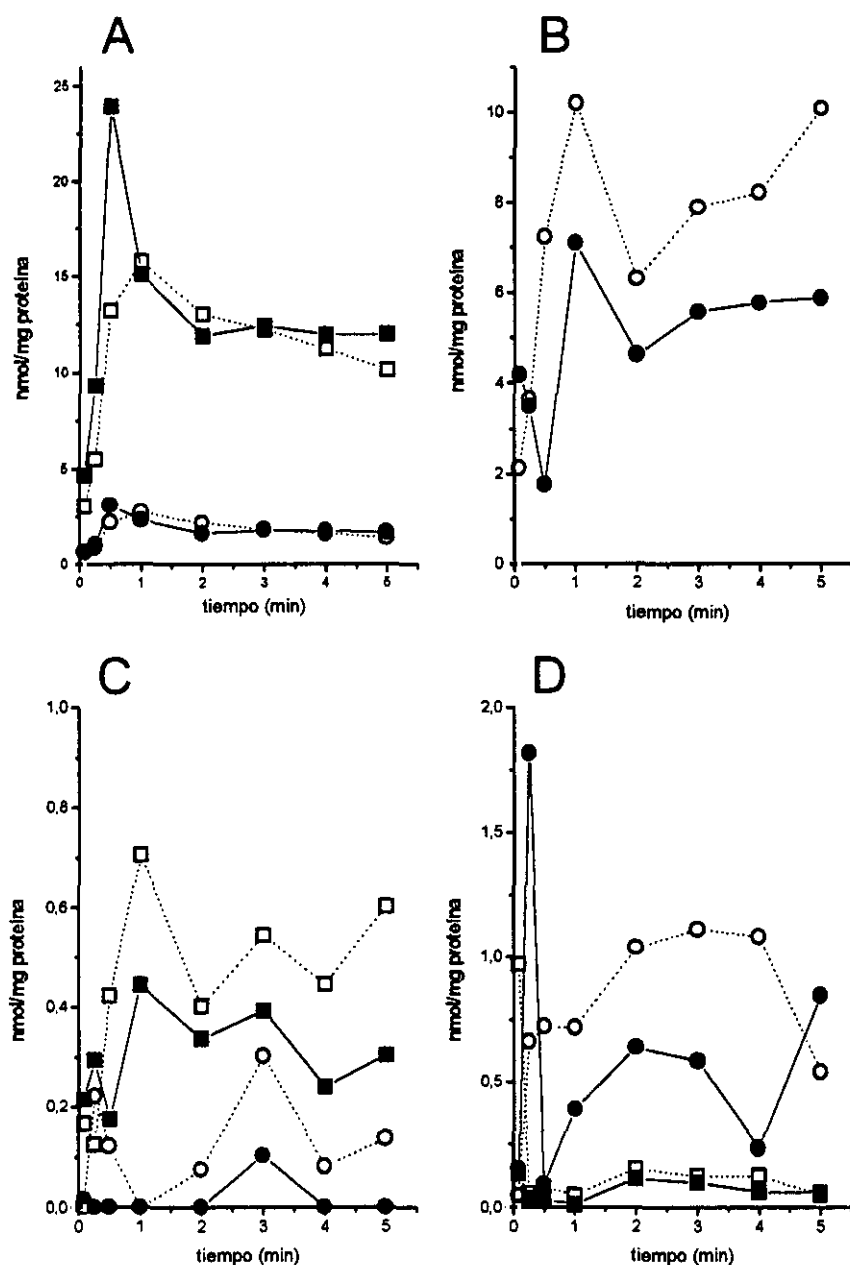
1986; Sonnleitner y Käppeli, 1986) o la idea del cuello de botella respiratorio (von Stockar y Auberson, 1992). También se puede provocar el disparo del metabolismo fermentativo en cultivos continuos con metabolismo respiratorio, mediante cambios repentinos de la tasa de dilución, incluso si estos implican pequeños incrementos en el flujo metabólico. ¡A veces es necesario que pasen un número tan elevado como cien tiempos de residencia para que los flujos metabólicos se estabilicen totalmente después de provocar el disturbio! (Postma y col., 1989b; van der Aar y col., 1990; Verduyn y col., 1992; Sonnleitner y Hahnemann, 1994).

Las respuestas transitorias se han empezado a estudiar en otras levaduras, en especial la variación de niveles de AMPc y su relación con la movilización de trehalosa, como en *Schizosaccharomyces pombe* y *Rhodotorula rubra*, además de *Candida utilis* (Mansure y col., 1992; Carrillo y col., 1994; Carrillo y col., 1995). En esta última levadura, los cambios que suceden en las fases de consumo transitoria no son tan tormentosos como los descritos en *Saccharomyces cerevisiae*. No es una levadura Crabtree positiva y ya hemos comentado la capacidad para que nuestra levadura puede asimilar fuentes de carbono fermentables, como la glucosa, después de un crecimiento sobre fuentes oxidables. Incluso, como ya describieron Vraná y col. (1989), Weusthuis y col. (1994a) y mostramos en esta Tesis, *Candida utilis* es capaz de sustentar su crecimiento simultáneamente sobre fuentes glucolíticas y gluconeogénicas, como se aprecian en mezclas de glucosa-etanol. Esta última característica no es posible en *Saccharomyces* por el estricto control ejercido por la represión catabólica. A su vez, los resultados obtenidos en nuestra levadura cuando se estudió la respuesta del AMPc en trabajos similares a los realizados con *Saccharomyces*, indicarían que el papel de este metabolito en la modulación de las respuestas tempranas tras la adición de glucosa no sería similar al descrito en otras levaduras (Carrillo y col., 1995). Los niveles del metabolito son altos de forma constante en las levaduras que han sido crecidas en presencia de glucosa, sin presentar la propiedad transitoria del pico de AMPc que se observa en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, aunque la respuesta metabólica mediada por la síntesis de AMPc requiere la fosforilación de glucosa, no afecta a los circuitos de represión en *Saccharomyces*. De esta manera, en principio, no estaríamos interesados en estudiar la evolución de la concentración de AMPc en *Candida utilis*.

Sin embargo, cabe la posibilidad de que la diferencia en el nivel de acumulación de algún metabolito glucolítico nos de idea de donde reside la razón de la desrepresión en la cepa mutante, como parece plausible según los trabajos del Prof. Zimmermann (Boles y col., 1993a; Boles y col., 1993b; Müller y col., 1995; Boles y col., 1996).

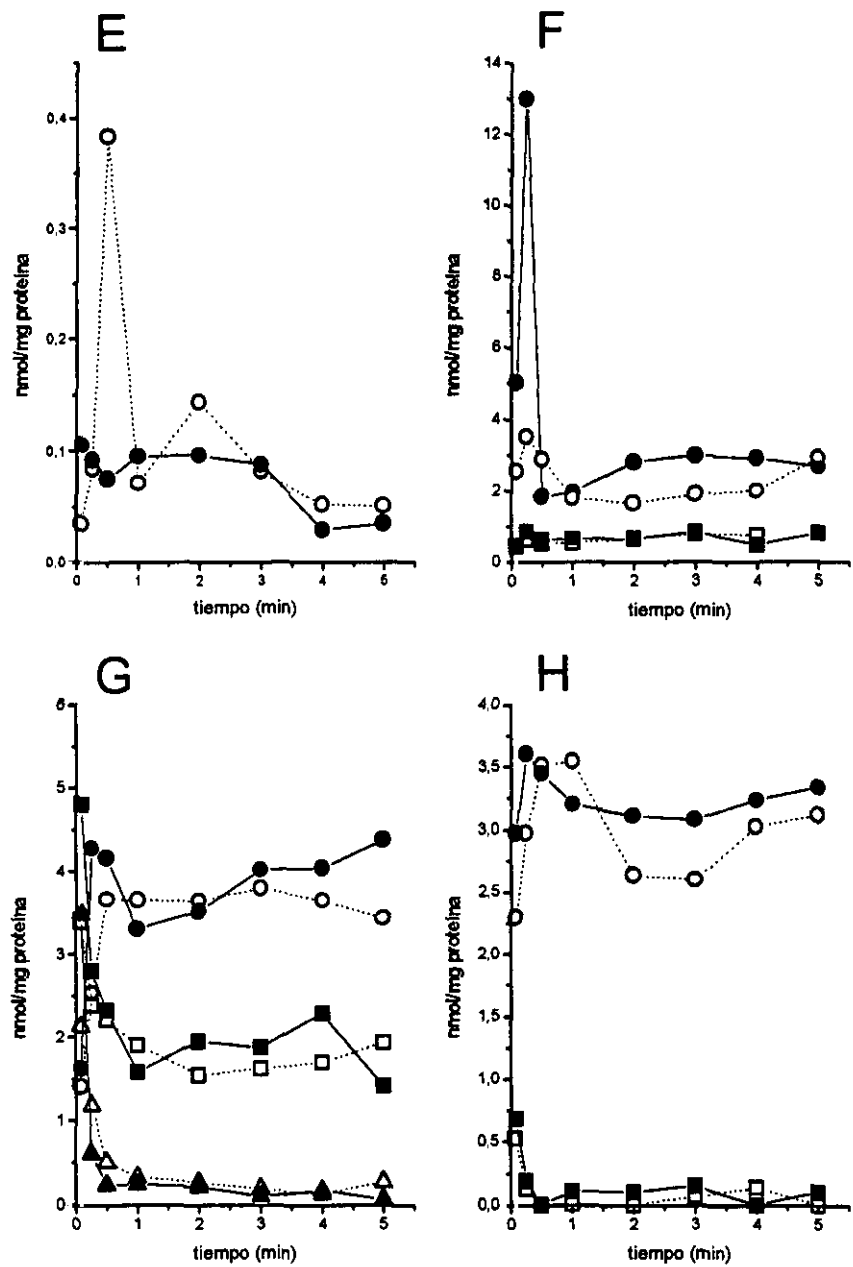
Debido a ello, utilizamos la técnica de extracción de metabolitos rápida en condiciones de pH neutro, desarrollada por de Koning y van Dam (1992), para analizar los cambios producidos en los niveles de los intermediarios metabólicos al introducir a las levaduras en medios con alta concentración de glucosa.

Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 48. La primera impresión fue observar como los niveles, en general, de los metabolitos estudiados fue similar en las dos cepas de *Candida utilis* estudiadas. En el mutante, se registran mayores concentraciones de algunos compuestos de 3 carbonos, como DHAP, gliceraldehído-3-fosfato y 3-fosfoglicerato, que sugieren que las velocidades de las enzimas implicadas en estas reacciones sean menores que las que se puedan obtener en la cepa salvaje, al menos durante el tiempo de transición. Pero el tiempo necesario para que las concentraciones de



**Fig. 48.** Concentración de metabolitos internos tras un pulso de glucosa 20 mM en células desenergizadas. Se representa con símbolos llenos y línea continua los datos pertenecientes a la cepa 3092. Con símbolos vacíos y líneas discontinuas, aparecen los valores de la cepa SDM-1. **A** Glucosa-6-P (□) y fructosa-6-P (○). **B** Fructosa-1,6-difosfato. **C** DHAP (□) y gliceraldehído-fosfato (○). **D** Ácido 2-fosfoglicérico (□) y ácido 3-fosfoglicérico (○).





**Fig. 48 (continuación).** E PEP. F Ácido pirúvico (○) y glicerol (□). G ATP (○), ADP (□) y AMP (Δ). H NAD (○) y NADH (□).

metabolitos alcanzaran valores estables fue más corto en la cepa parental que en el mutante. La razón de esto se debió a la diferente capacidad para transportar glucosa que se midió en ambas cepas. Ya demostramos que la cepa parental posee una mayor capacidad instantánea de transporte, por lo que es esperable que el flujo inicial sea más rápido que en el mutante. Esto se pudo observar con claridad en la cinética de acumulación inicial de glucosa-6-fosfato. El pico de acumulación registrado en los primeros instantes tras el pulso de glucosa, fue mayor en la cepa parental que en el mutante. Sin embargo, la potencialidad del transporte, permitiría predecir una acumulación mayor del producto fosforilado (que no sobrepasa 25 nmol/mg proteína), puesto que ya hemos comprobado que la actividad hexoquinasa máxima excede a la capacidad de transporte en las condiciones de experimentación (Fig. 48A). El que el nivel estable de glucosa-6-P en ambas cepas sea similar, hace inconsistente la posibilidad de que este metabolito sea responsable de las diferencias de transporte de glucosa encontradas entre el mutante y la cepa parental (Rizzi y col, 1996), si este fenómeno tuviera lugar en *Candida utilis*.

La diferencia de concentraciones encontradas al comparar la evolución de la glucosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato, nos permite predecir que el sentido de la reacción de isomerización esté orientado hacia la evacuación de glucosa-6-fosfato al fondo de la glucolisis (Fig. 48A). Creemos que los intermediarios iniciales del flujo glucolítico no se acumulan en mayor cantidad pues las enzimas situadas en los siguientes pasos del flujo funcionaron a una velocidad alta. Se puede apreciar en la cepa parental picos de acumulación correspondientes a 3-fosfoglicerato, PEP y pirúvico en los primeros instantes después de la adición del pulso, simultáneos al aumento de glucosa-6-fosfato. Esto puede ser debido a la movilización del remanente de metabolitos que permanecieran en las células desenergizadas. La interpretación de los resultados también encajaría si asumiéramos que la velocidad de transmisión de la ola del flujo glucolítico fuera muy rápida. Esto último sería consistente con el análisis del patrón de acumulación de los metabolitos iniciales de la glucolisis. La rápida desaparición de los niveles iniciales de hexosas-6-fosfato solo sería posible si las enzimas situadas en la parte final de la glucolisis mostraran una actividad alta desde el inicio del pulso de glucosa.

Entre las enzimas más relevantes en el flujo glucolítico, cabe reseñar la fructosa-6-fosfato quinasa. Esta enzima está fuertemente regulada en *Saccharomyces cerevisiae*, pues resulta ser uno de los puntos claves donde actúan los mecanismos de transición entre el metabolismo gluconeogénico y glucolítico (Avigad, 1981; Bartrons y col., 1982; Lagunas y col., 1982; Hofmann y Kopperschläger, 1982; Reibstein y col., 1986; Gancedo y Serrano, 1989; Kretschmer y Fraenkel, 1991; Gancedo, 1992). Puede ser regulada alostéricamente por fructosa-2,6-difosfato, fructosa-6-fosfato, ATP y AMP, además la actividad puede depender de iones amonio y fosfato. Todos los factores influyen para que el nivel de actividad se relacione con la velocidad del flujo metabólico de la levadura (Sierkstra y col., 1992). Además la determinación de la velocidad de la enzima *in vitro* se corresponde con los niveles máximos de flujo en *Saccharomyces* (citado en Gancedo y Serrano, 1989), aunque resulta arriesgado afirmar que esto ocurre *in vivo* tras un pulso de glucosa, debido a la compleja regulación de la actividad, pues se ha establecido que, aunque se necesita pocos minutos para activar la síntesis del activador fructosa-2,6-difosfato, se requiere 20 minutos para apreciar el efecto de las fuentes fermentables en la fructosa-6-fosfato quinasa (Kretschmer y Fraenkel, 1991; Kretschmer y col., 1991). Por otro lado, el papel clave de esta enzima como marcador de la velocidad de la glucolisis se ha discutido, pues la

sobreproducción de la enzima no implica un aumento importante de la velocidad de consumo de fructosa (Schaaff y col., 1989). Las razones de esto son complicadas, aunque se pueden resumir en Snoep y col. (1995). Otros trabajos indican que la regulación alostérica de esta enzima no resulta esencial para el crecimiento de la levadura en condiciones de laboratorio (Heinisch y col., 1995). Aunque en Gancedo y Serrano (1989) se cita que esta enzima en *Candida utilis* está sujeta a una regulación por la fuente de carbono, nuestros datos indican que la actividad de esta enzima es alta en cualquier caso, al observar los bajos niveles de fructosa-6-fosfato, que la actividad de esta enzima alcanza altos niveles después de un periodo de tiempo corto tras la adición de glucosa (1 min.), puesto que en este plazo de tiempo se corrige la tendencia de acumulación de fructosa-6-fosfato. No parece que esta actividad sea rápidamente inhibida por los altos niveles de ATP que se observan tras la adición del pulso de glucosa, como sucede en *Saccharomyces* (Bar y col., 1990).

Otra de las enzimas sometidas a regulación en *Saccharomyces cerevisiae* es la piruvato quinasa (Burke y col., 1983; Moore y col., 1991). El paso de PEP a pirúvico es uno de los pasos más controlado en la glucólisis (Torres y col., 1995). En la cepa parental, una vez absorbido el pico de acumulación de PEP y pirúvico, los niveles estables de ambos compuestos son semejantes a los mostrados en la cepa mutante (**Fig. 48E y F**). Esto indica la existencia de niveles suficientes de actividad de la piruvato quinasa en nuestras levaduras, confirmando los resultados de anteriores apartados, aunque se había comunicado lo contrario en trabajos anteriores (Gancedo y col., 1967). Confirmamos, al comparar los niveles de pirúvico estables en ambas cepas, como el flujo metabólico resultante ha de ser similar en la cepa parental y la mutante.

La observación de los niveles de NAD y NADH (**Fig. 48H**), confirman los resultados respirométricos y los procedentes de cultivos en continuo, que muestran el metabolismo oxidativo de nuestras levaduras, en condiciones de oxigenación. Corrobara esta conclusión los bajos niveles de glicerol detectados (**Fig. 48F**). Este compuesto es producido en levaduras con oxigenación insuficiente para el mantenimiento del potencial redox (Gancedo y col., 1968; Oura, 1977). Nosotros no lo detectamos en los efluentes de cultivos continuos, donde la  $pO_2$  permanecía alta, de acuerdo a las predicciones de Weusthuis (1994), donde la producción de glicerol cesaba en *Candida utilis* cuando la tasa de consumo de oxigenación en el fermentador superaba los 3 mmol  $O_2$ /(l.h).

En el análisis del nivel energético de las cepas, encontramos, como era esperable, que los niveles de ATP aumentan tras el pulso de glucosa, mientras que los de ADP y AMP disminuyen (**Fig. 48G**). Aunque es teóricamente esperable que la suma de los nucleótidos-fosfato sea constante, comprobamos que no lo es en el intervalo de tiempo estudiado. **Tabla XLIII**.

Este resultado es explicable en estados transitorios, donde se registran la movilización de moléculas conteniendo grupos fosfato, además de la posible existencia de reacciones biosintéticas y de mantenimiento que requieren ATP. Sin embargo, existe un aumento neto en la generación de poder energético tras la adición de glucosa. El hipotético desplome de los niveles de ATP, que se predice en los instantes próximos a la adición de glucosa y que es predecible con modelos de consumo de lactosa y glucosa (Nielsen y col., 1991), ha de tener lugar durante tiempos extremadamente cortos de tiempo, pues nosotros observamos un aumento de la concentración del nucleótido, sin distinguir el momento de

descenso. En *Saccharomyces cerevisiae*, esto ocurre en los primeros 10 segundos tras pulsar glucosa, y la recuperación de los niveles de ATP se inicia después de los primeros 30 segundos (Rizzi y col., 1993; Theobald y col., 1993).

**Tabla XLIII.** Evolución de los nucleótidos fosfato en estado transitorios tras la adición de un pulso de glucosa<sup>1</sup>.

	tiempo tras adición del pulso (min.)							
	0.08	0.25	0.5	1	2	3	4	5
<b>3092</b>								
ATP+ADP+AMP	9.91	7.69	6.72	5.13	5.69	5.99	6.25	5.86
ATP/(nucleótidos)	0.16	0.55	0.62	0.64	0.62	0.67	0.64	0.74
<b>SDM-1</b>								
ATP+ADP+AMP	6.94	6.10	6.38	5.89	5.47	5.61	5.47	5.63
ATP/(nucleótidos)	0.20	0.41	0.57	0.62	0.67	0.68	0.67	0.61

<sup>1</sup> Los valores de concentraciones están dados en nmol/mg proteína. El valor ATP/(nucleótidos) indica la proporción de ATP entre el total de nucleótidos de adenosina totales.

Es difícil extrapolar los resultados conseguidos con otros publicados. En primer lugar porque se refieren a otras levaduras. Ni los estados fisiológicos de las células utilizadas, ni las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de los metabolitos son homogéneas en los distintos trabajos publicados. Es de señalar, por otro lado, que el método de extracción y cuantificación de los metabolitos utilizado por nosotros parece ser el que mejor retrata las concentraciones reales de los metabolitos ensayados, según la discusión crítica en de Koning y van Dam (1992).

Sin embargo, la evolución de los metabolitos, en los consumos de glucosa, básicamente se corresponden a lo esperable en otras levaduras (Rizzi y col., 1993).

La conclusión obtenida es que no poseemos datos, a excepción de la leve diferencia de concentraciones encontrada en los análisis de los compuestos de 3 átomos de carbono, que nos permitan sospechar que la razón de la desrepresión en el mutante se deba a la diferencia en la acumulación o niveles estacionarios de ningún metabolito del flujo glucolítico. En el caso de que la regulación de la expresión de genes glucolíticos dependan de metabolitos en *Candida utilis*, no deduciríamos una síntesis diferencial entre las dos cepas estudiadas, que nos indicara que ahí residiera una posible causa de desrepresión en la cepa SDM-1. Tampoco podemos determinar que las hexoquinasas del mutante tengan menor actividad catalítica *in vivo*, a pesar de las diferencias respecto a la utilización de glucosa y regulación por metabolitos descrita en los apartados anteriores, incluso si asumiéramos la posibilidad de regulación de la expresión génica influenciada por niveles

de metabolitos, como se exponen en los trabajos señalados del Prof. Zimmermann para *Saccharomyces cerevisiae*.

Recientemente se ha comunicado el efecto inhibitor de la acumulación de glucosa-6-fosfato en el transporte de glucosa (Rizzi y col., 1996). Nos preguntamos si dicho efecto puede tener lugar en *Candida*. Las dos cepas de nuestro trabajo mostraron una capacidad de transporte instantáneo de glucosa muy distinta y, en la mayor parte de los casos, superior a la tasa de consumo de glucosa. Sin embargo, la velocidad con que la glucosa se consume es similar en el mutante y en la cepa parental. Sería previsible que el efecto inhibitor de la glucosa-6-fosfato fuera proporcional a la concentración intracelular del metabolito. Como hemos comprobado que la acumulación del metabolito es semejante en las dos levaduras, deduciríamos, sin embargo, que la acción de la glucosa-6-fosfato sería más acusada en la cepa parental que en el mutante, pues la diferencia entre las velocidades de entrada de glucosa y las de consumo es más acentuada en la cepa 3092. Por otro lado, ya hemos determinado que la capacidad instantánea de transporte puede explicar la velocidad de consumo de glucosa a bajas y medias concentraciones de sustrato, sin necesidad de acudir a efectos indirecto de metabolitos.

Sin embargo, aunque el metabolismo y concentración de metabolitos glucolíticos estables, observamos pequeñas diferencias en los instantes iniciales del metabolismo de glucosa. Como hemos discutido, creemos que estos resultados son consistentes con una diferencia en la capacidad inicial de transporte del azúcar. Para confirmar nuestra hipótesis, examinamos la capacidad de las células para consumir oxígeno después de un pulso de glucosa.

Observamos como la cepa parental puede consumir oxígeno más rápidamente que la mutante en el primer minuto después de la adición de glucosa, aunque transcurrido un intervalo de tiempo mayor la velocidad de consumo se hace similar en ambas cepas.

Los

en la piruvato quinasa son funcionamiento Sólo si la fructosa-6-fosfato quinasa tuviera una alta actividad *in vivo* permitiría explicar por qué no se acumula una mayor cantidad de intermediarios glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha descrito que la máxima actividad de esta enzima son similares al los flujos máximos de consumo de glucosa (Serrano y Gancedo, 1989), pero es arriesgado afirmar que esto ocurra *in vivo* por la compleja regulación de esta enzima en esta levadura. Incluso responde a cambios en el nivel de metabolitos, pues se activa alostéricamente por fructosa-6-fosfato, fructosa-2,6-difosfato y AMP; se inhibe por ATP, tal como aparece en la revisión de Gancedo y Serrano, 1989. Sin embargo, el papel clave de esta enzima como marcador de la velocidad de la glucólisis se ha discutido, pues la sobreproducción de la enzima no implica un aumento importante de la velocidad de consumo de fructosa (Schaaff y col., 1989). Las razones de esto son complicadas, aunque se pueden resumir en Snoep y col. (1995). Es reseñable que en la cepa mutante, la actividad fosforilante de fructosa-6-fosfato parece responder inmediatamente al pulso de glucosa, pues se acumula el producto fructosa-1,6-difosfato. Sin embargo, la cepa parental no sigue este mismo patrón de acumulación. La razón parece encontrarse en las etapas posteriores de la glucólisis. En el mutante, se registran mayores concentraciones de algunos compuestos de 3 carbonos, como DHAP, gliceraldehído-3-fosfato y 3-fosfoglicerato, que sugieren que las velocidades de las enzimas implicadas en estas reacciones sean menores que las que se puedan obtener en la

---

cepa salvaje, al menos durante el tiempo de transición. De acuerdo a la mayor capacidad instantánea de consumo de glucosa, se han observado acumulaciones de 3-fosfoglicerato, PEP, y pirúvico en la cepa parental, durante los primeros instantes del pulso de glucosa. Aparentemente, las enzimas encargadas del procesamiento de los intermediarios de tres carbonos en la cepa parental, son capaces funcionar inmediatamente después del pulso de glucosa, pues se registran acumulaciones temporales de metabolitos, coincidentes con de resp de esta enzregulacion esta afirmación no ese corresponde con los valores de Sin embargo, se ha descrito que la actividad máxima de la fueraAsumiendo que la.ón enco Observamos también que la concentración de glucosa-6-fosfato es sustancialmente. De aquí se puede concluir que las dudas planteadas tras el hallazgo de una reducida actividad hexoquinasa en el mutante en condiciones fisiológicas (ver apartado 3.6.1.), se solucionan al averiguar que no implican ningún defecto de acumulación de los metabolitos situados tras el paso de la reacción hexoquinasa.

### 3.7. Comentarios finales.

Durante la exposición de los resultados obtenidos por nosotros, hemos comprobado como no parece que las hexoquinasas tengan un papel en el control de represión, al menos de acuerdo al modelo descrito en *Saccharomyces cerevisiae*. No podemos excluir, sin embargo que las hexoquinasas puedan ejercer su papel regulador mediante algún tipo de mecanismo que no ha podido ser descubierto por nosotros (Herrero y col., 1994), pues los resultados de nuestros experimentos indican que es necesario el paso de fosforilación para que se desencadene la represión del consumo de distintas fuentes de carbono.

Cuando hemos examinado las cinéticas de transporte de glucosa, hemos comprobado con sorpresa, que esta actividad excede la capacidad de asimilación del sustrato en condiciones de consumo estable. Las cinéticas reveladas por nosotros han mostrado que no es esperable una regulación de la actividad de transporte por difusión facilitada debida a un metabolismo estable del azúcar, pues hemos podido predecir el consumo de glucosa en condiciones *in vivo* con los datos de transporte obtenidos *in vitro*.

No sabemos por qué esta levadura mantiene una capacidad de transporte superior a la del consumo, ni su significación fisiológico. Parece que el exceso de transporte solo sería útil para la célula en estados de consumo transitorios y sugerimos que esta pudiera tener ventajas respecto a otros microorganismos en los procesos de adaptación a entornos con alta concentración de glucosa. Exponemos a continuación nuestra hipótesis:

Se ha descrito que *Candida utilis* es capaz de multiplicar por 3 la capacidad de consumo de glucosa en experimentos de pulso (van Urk y col., 1988). Estos datos confirman nuestras observaciones con concentraciones de glucosa relativamente pequeñas que indican que la tasa de consumo de glucosa está determinada por la capacidad de la levadura para transportarla. Parece que la capacidad del resto de la maquinaria necesaria para consumir glucosa permanece en exceso en condiciones de limitación de glucosa. Nuestra levadura solo manifiesta un metabolismo fermentativo, cuando la concentración de glucosa externa es muy alta (van Dijken y Scheffers, 1986), por lo tanto es esperable que la glucosa pulsada sea asimilada por un metabolismo respiratorio, altamente eficiente.

La velocidad de crecimiento de un microorganismo se ve determinada por la eficacia en la transformación de los sustratos consumidos y por la velocidad con que estos son asimilados. El mantenimiento de un metabolismo respiratorio implica que el parámetro  $Y$  permanece casi constante para casi todas las concentraciones de glucosa. En metabolismos fermentativos,  $Y$  es, por definición energética más pequeño que en condiciones de respiración.

Sin embargo, la adición de glucosa fresca implicaría un aumento importante en el valor de toma de sustrato de forma instantánea, con lo que es esperable un aumento de la tasa de formación de nueva biomasa. La nueva biomasa contribuiría a ocupar rápidamente el nuevo habitat alterado por la adición de glucosa.

El estudio fisiológico del mutante SDM-1, ha permitido averiguar que es posible un funcionamiento metabólico casi normal incluso cuando la capacidad de transporte de glucosa se ve reducida a la mitad en comparación a los valores de la cepa parental. Este resultado confirmaría nuestra hipótesis sobre la ausencia de un papel fisiológico del exceso de la capacidad de transporte en condiciones de crecimientos estables.

El hallazgo de que el mutante ha mostrado escasas diferencias en la actividad catalítica de fosforilación de hexosas, ha reafirmado nuestra hipótesis de la ausencia de un

papel en el control de represión en el paso de hexosa a hexosa-fosfato.

Como se ha expuesto para el consumo de glucosa, la capacidad para asimilar otras fuentes glucolíticas distintas a glucosa, depende de la velocidad máxima con que la maquinaria específica de este metabolismo funcione *in vivo*. A su vez, la cantidad de actividad enzimática propia de cada sustrato puede depender de la tasa de consumo del propio sustrato. Esto se puede comprobar con los experimentos realizados en el mutante en medios con presencia de maltosa.

También hemos comprobado que es posible la existencia de mutantes desreprimidos naturales sin capacidades metabólicas reducidas, esto no ha sido así en el caso de otras levaduras, pues se han comunicado la existencia de mutantes desreprimidos por la baja capacidad de consumo de glucosa (Boze y col., 1989; Novak y col., 1990; Alamäe y Sismisker, 1994). Esto sugiere que la llamada señal de glucosa para desencadenar represión no parece residir meramente en una alta velocidad de consumo de glucosa.

Las determinaciones de los valores de acumulación de metabolitos han reafirmado las observaciones respecto a la caracterización de los parámetros de crecimiento en el mutante. La cepa SDM-1 se muestra desreprimida aun manteniendo unos parámetros de acumulación de metabolitos glucolíticos semejantes a la cepa parental. Si asumieramos que la acumulación de determinados metabolitos puede tener relación con el nivel de actividad de determinadas enzimas glucolíticas, tal como se ha comunicado en *Saccharomyces* (Boles y col., 1993), tendríamos que descartar que el control de represión catabólica dependa, al menos para el consumo de azúcares distintos a las hexosas, de este tipo de regulación.

Así, el planteamiento de un modelo, con el descubrimiento de puntos ciertos y pasos del control de represión en *Candida utilis*, no ha sido posible. Todo lo que podemos concluir con un abordaje fisiológico es desechar posibles mecanismos de control que han sido descritos en otras levaduras. Creemos que es necesario un abordaje molecular para desvelar cuales son los elementos íntimos del control de represión. La publicación reciente de un sistema de clonaje, haría posible este proyecto.



## Conclusiones

1. *Candida utilis* posee una actividad de fosforilación de hexosas inusual respecto al modelo desarrollado con el patrón de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su regulación por fuente de carbono, fase de crecimiento, efectores fisiológicos y relación con el control de represión.
2. Hemos aislado y caracterizado fisiológicamente un mutante desreprimido para el consumo de disacáridos. El carácter desreprimido no afecta gravemente a los parámetros de crecimiento de esta cepa. Aunque no ha mostrado ventajas respecto a la cepa parental en cultivos con fuentes de carbono mixtas, sugerimos su potencial aplicación en procesos de purificación de compuestos azucarados a partir de una mezcla de sustratos.
3. El estudio de la actividad hexoquinasa, la velocidad de consumo de glucosa, la velocidad de transporte de la misma y el patrón de acumulación de metabolitos glucolíticos, indica que no se espera que en ellos resida la causa de desrepresión del mutante.
4. La cepa de *Candida utilis* parental posee, en condiciones de crecimiento estable, una capacidad de transporte de glucosa que excede la velocidad con que la levadura puede asimilarla. El componente de difusión facilitada es constitutivo. Sin embargo es posible la modulación de la capacidad máxima de esta actividad por fuente de carbono, como sugieren los resultados de la cepa SDM-1.
5. La velocidad de transporte condiciona la tasa de toma de glucosa en *Candida utilis*, cuando la concentración del azúcar no satura la capacidad de consumo. Esta característica es independiente del carácter reprimido o desreprimido de las cepas estudiadas.
6. La actividad de la maquinaria enzimática específica para el consumo de disacáridos depende de la tasa metabólica sustentada por la levadura. De esta manera carece de sentido hablar de niveles estáticos de actividad en estado de represión, basal o inducido.

## **Bibliografía**

## Bibliografía

---

- Admassu, W.; Korus, R.A.** (1983). Two-continuous fermentation of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Candida utilis*. *Biotech. Bioeng.* 25. 2641-2651.
- Alamãe, T.; Sismisker, J.** (1994). Isolation and preliminary characterization of *Pichia pinus* mutants insensitive to glucose repression. *Yeast*. 10. 1459-1466.
- Albig, W.; Entian, K.D.** (1988). Structure of yeast glucokinase, a strongly diverged specific aldo-hexose-phosphorylating isoenzyme. *Gene*. 73. 141-152.
- Alsina, A.; Mason, M.; Uphoff, R.A.; Riggsby, W.S.; Becker, J.M.; Murphy, D.** (1988). Catheter-associated *Candida utilis* fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. *J. Clin. Microbiol.* 26. 621-624.
- Alterthum, F.; Dombek, K.M.; Ingram, L.O.** (1989). Regulation of glycolytic flux and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of intracellular adenine nucleotide concentrations on *in vitro* activities of hexokinase, phosphofructokinase, phosphoglycerate kinase, and pyruvate kinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55. 1312-1314.
- Anderson, R.L.; Sapico, V.L.** (1975). D-fructose (D-mannose) kinase. *En Methods in enzymology*. Vol. 42c. (Ed. WA Wood). pp. 39-43. Academic Press. Nueva York.
- André, B.** An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 11. 1575-1611.
- Arst, H.N. Jr; Scazzocchio, C.** (1985). Formal genetics and molecular biology of the control of gene expression in *Aspergillus nidulans*. *En Gene manipulations in Fungi*. (Ed. JW Bennet y LL Lasure). pp. 309-343. Academic Press. Nueva York.
- Avigad, G.** (1981). Stimulation of yeast phosphofructokinase activity by fructose-2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102. 985-991.
- Azam, F.; Kotyk, A.** (1969). Glucose-6-phosphate as regulator of monosaccharide transport in baker's yeast. *FEBS Lett.* 2. 333-335.
- Babel, W.; Müller, R.H.** (1985). Mixed substrate utilization in micro-organisms: biochemical aspects and energetics. *J. Gen. Microbiol.* 131. 39-45.
- Bailey, R.B.; Woodward, A.** (1984). Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 193. 507-512.
- Bar, J.; Martínez-Costa, O.H.; Aragón, J.J.** (1990). Regulation of phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme studied by stopped-flow measurements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167. 1214-1220.
- Barford, J.P.; Hall, R.J.** (1981). A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotech. Bioeng.* 23. 1735-1762.
- Barnard, E.A.** (1975). Hexokinases from yeasts. *En Methods in Enzymology*. Vol. 42c. (Ed. WA Wood). pp. 6-20. Academic Press. Nueva York.
- Barnett, J.A.** (1981). The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 39. 347-404.
- Barnett, J.A.** (1992). Some controls on oligosaccharides utilization by yeasts: The physiological basis of the Kluyver effect. *FEMS Microbiol. Lett.* 100. 371-378.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D.** (1990). *Yeasts: Characteristics and identification*. 2ª Edición. Cambridge University Press. Cambridge.

## Bibliografía

---

- Barnett, J.A.; Sims, A.P.** (1976a). Some physiological observations on the uptake of D-glucose and 2-deoxy-D-glucose by starving and exponentially-growing yeasts. *Arch. Microbiol.* 111, 185-192.
- Barnett, J.A.; Sims, A.P.** (1976b). A note on the kinetics of uptake of D-glucose by the food yeast, *Candida utilis*. *Arch. Microbiol.* 111, 193-194.
- Barnett, J.A.; Sims, A.P.** (1982). The requirements of oxygen for the active transport of sugars into yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2303-2312.
- Bartrons, R.; van Schaftingen, E.; Vissers, S.; Hers, H.G.** (1982). Stimulation of yeast phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate. *FEBS Lett.* 143, 137-140.
- Becher-dos Passos, J.; Vanhalewyn, M.; Brandão, R.L.; Castro, I.M.; Nicoli, J.R.; Thevelein, J.M.** (1992). Glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1136, 57-67.
- Benito, B.; Lagunas, R.** (1992). The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. *J. Bacteriol.* 174, 3065-3069.
- Bergmeyer, H.U.** (1985a). Methods of enzymatic analysis. Vol. VI. VCH Publishers. Deerfield Beach.
- Bergmeyer, H.U.** (1985b). Methods of enzymatic analysis. Vol VII. VCH Publishers. Deerfield Beach.
- Bisson, L.F.** (1988). High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control. *J. Bacteriol.* 170, 4838-4845.
- Bisson, L.F.; Carlsson, M.** (1994). Altered regulatory responses to glucose are associated with a glucose transport defect in *grr1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 136, 1279-1285.
- Bisson, L.F.; Coons, D.M.; Kruckerberg, A.L.; Lewis, D.A.** (1993). Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259-308.
- Bisson, L.F.; Fraenkel, D.G.** (1983a). Transport of 6-deoxy-D-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 155, 995-1000.
- Bisson, L.F.; Fraenkel, D.G.** (1983b). Involvement of the kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 1730-1734.
- Bisson, L.F.; Neigeborn, L.; Carlson, M.; Fraenkel, D.G.** (1987). The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 1656-1662.
- Blázquez, M.A.; Gancedo, C.** (1995). Mode of action of the *qcr9* and the *cat3* mutations in restoring the ability of *Saccharomyces cerevisiae* *tps1* mutants to grow on glucose. *Mol. Gen. Genet.* 249, 655-664.
- Blázquez, M.A.; Lagunas, R.; Gancedo, C.; Gancedo, J.M.** (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Letters.* 329, 51-54.
- Blázquez, M.A.; Stucka, R.; Feldmann, H.; Gancedo, C.** (1994). Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 176, 3895-3902.
- Boles, E.; Heinisch, J.; Zimmermann, F.K.** (1993a). Different signals control the activation of glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 9, 761-770.
- Boles, E.; Zimmermann, F.K.** (1993b). Induction of pyruvate decarboxylase in glycolysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the concentrations of 3-carbon glycolytic metabolites. *Arch. Microbiol.* 160, 324-328.

## Bibliografía

---

- Boles, E.; Müller, S.; Zimmermann, F.K.** (1996). A multi-layered sensory system controls yeast glycolytic gene expression. *Mol. Microbiol.* 19, 641-642.
- Boy-Marcotte, E.; Tadi, D.; Perrot, M.; Boucherie, H.; Jacquet, M.** (1996). High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 142, 459-467.
- Boze, H.; Moulin, G.; Galzy, P.** (1989). Isolation and characterization of a hexokinase mutant of *Schwanniomyces castellii*: consequences on cell production in continuous culture. *Yeast*. 5, 469-476.
- Boze, H.; Moulin, G.; Galzy, P.** (1992). Production of food and fodder yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 65-86.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breitenbach-Schmitt, I.; Schmitt, H.D.; Heinisch, J.; Zimmermann, F.K.** (1984). Genetic and physiological evidence for the existence of a second glycolytic pathway in yeast parallel to the phosphofructokinase-aldolase reaction sequence. *Mol. Gen. Genet.* 195, 536-540.
- Broach, J.R.; Deschenes, R.J.** (1990). The function of RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Cancer Res.* 54, 79-139.
- Bruinenberg, P.M.; van Dijken, J.P.; Scheffers, W.A.** (1983a). An enzymatic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 965-971.
- Bruinenberg, P.M.; van Dijken, J.P.; Scheffers, W.A.** (1983b). A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 129, 953-964.
- Burke, R.L.; Tekamp-Olson, P.; Najarian, R.** (1983). The isolation, characterization and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258, 2193-2201.
- Burlini, N.; Morandi, S.; Pellegrini, R.; Tortosa, P.; Guerritone, A.** (1989). Studies on the degradative mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1014, 153-161.
- Carrillo, D.; Vicente-Soler, J.; Fernández, J.; Soto, T.; Cansado, J.; Gacto, M.** (1995). Activation of cytoplasmic trehalase by cyclic-AMP-dependent and cyclic-AMP-independent signalling pathways in the yeast *Candida utilis*. *Microbiology*. 141, 679-686.
- Carrillo, D.; Vicente-Soler, J.; Gacto, M.** (1994). Cyclic AMP signalling pathways and trehalase activation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*. 140, 1467-1472.
- Cartwright, C.P.; Rose, A.H.; Calderbank, J.; Keenan, M.H.J.** (1989). Solute transport. *En The Yeasts*. Vol. 3. 2ª Edición. (Ed. AH Rose y JS Harrison). pp. 4-56. Academic Press. Londres.
- Castrillo, J.I.; Ugalde, U.O.** (1993). A general model of yeast energy metabolism in aerobic chemostat culture. *Yeast*. 10, 185-197.
- Catálogo Chemap, AG, Mänendorf.** SCP-plants based on carbohydrates.
- Celenza, J.L.; Carlson, M.** (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*. 233, 1175-1180.
- Celenza, J.L.; Carlson, M.** (1989). Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5034-5044.

## Bibliografía

---

- Ciriacy, M.; Freidel, K.; Reifenger, E. (1995). Multiple hexose transporters in *S. cerevisiae*: impact on flux. *Resúmenes de Control of Metabolic Flux: Metabolic Pathway Engineering in Yeasts*. (European Research Conferences). p. 12. Granada.
- Clifton, D.; Walsh, R.B.; Fraenkel, D.G. (1993). Functional studies of yeast glucokinase. *J. Bacteriol.* 175. 3289-3294.
- Conklin, D.S.; Kung, C.; Culbertson, M.R. (1993). The COT2 gene is required for glucose-dependent divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13. 2041-2049.
- Coons, D.M.; Boulton, R.B.; Bisson, L.F. (1995). Computer-assisted nonlinear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177. 3251-3258.
- Costa, E. (1974). Los organismos unicelulares como fuente de proteínas. Discurso de recepción en la Real Academia Nacional de Medicina, 21 de mayo. Madrid.
- Cherry, J.R.; Johnston, T.R.; Dollard, C.; Shuster, J.R.; Denis, C.L. (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional factor ADR1. *Cell*. 56. 409-419.
- Chiang, H.L.; Schekman, R. (1991). Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature*. 241. 55-59.
- de Bruijne, A.W.; Schuddemat, J.; van den Broek, P.J.A. (1988). Regulation of sugar transport systems of *Kluyveromyces marxianus*: the role of carbohydrates and their catabolism. *Biochim. Biophys. Acta*. 939. 569-576.
- de Koning, W.; van Dam, K. (1992). A method for determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*. 204. 118-123.
- de Koning, W.; Groeneveld, K.; Oehlen, L.J.W.M.; Berden, J.A.; van Dam, K. (1991). Changes in the activities of key enzymes of glycolysis during the cell cycle in yeast: a rectification. *J. Gen. Microbiol.* 137. 971-976.
- De la Fuente, G.; Lagunas, R.; Sols, A. (1970). Induced fit in yeast hexokinase. *Eur. J. Biochem.* 16. 226-233.
- Dedyukhina, E.G.; Eroshin, V.K. (1991). Essential metal ions in the control of microbial metabolism. *Process Biochem.* 26. 31-37.
- Derrick, S.; Large, P.J. (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* 139. 2783-2792.
- Dombek, K.M.; Ingram, L.O. (1988). Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in rate of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* during batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54. 98-104.
- Egilsson, V.; Gudnason, V.; Jónasdóttir, A.; Ingvarsson, S.; Andresdóttir, V. (1986). Catabolite repression effects of 5-thio-D-glucose on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132. 3309-3313.
- Egli, T.; Lendenmann, U.; Snozzi, M. (1992). Microbial growth kinetics during simultaneous utilization of mixtures of carbon substrates. VI International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona. pp. 118.
- Egli, T.; Lendenmann, U.; Snozzi, M. (1993). Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63. 289-298.
- Entian, K.D. (1977). Lack of carbon catabolite inactivation in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexokinase activity. *Mol. Gen. Genet.* 158. 201-210.
- Entian, K.D. (1980). Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon

## Bibliografía

---

catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 633-637.

Entian, K.D.; Frölich, K.U. (1984a). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **158**, 29-35.

Entian, K.D.; Frölich, K.U. (1984b). Regulation of enzymes and isoenzymes of carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **799**, 181-186.

Entian, K.D.; Barnett, J.A. (1992). Regulation of the sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 506-510.

Entian, K.D.; Zimmermann, F.K. (1980). Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 345-350.

Eraso, P.; Gancedo, J.M. (1984). Catabolite repression in yeast is not associated with low levels of cAMP. *Eur. J. Biochem.* **141**, 195-198.

Ernandes, J.R.; D'Amore, T.; Russell, I.; Stewart, G.G. (1992). Regulation of glucose and maltose transport in strains of *Saccharomyces*. *J. Industrial Microbiol.* **9**, 127-130.

Espinell, A.E. (1991). Enzimas fosforilantes de hexosas en *Candida utilis* IGC 3092. Tesina de Licenciatura. Madrid.

Fernández, R.; Herrero, P.; Fernández, E.; Fernández, T.; López-Boado, Y.S.; Moreno, F. (1988). Autophosphorylation of yeast hexokinase PII. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2493-2498.

Fernández, R.; Herrero, P.; Fernández, M.T.; Moreno, F. (1986). Mechanism of inactivation of hexokinase PII of *Saccharomyces cerevisiae* by D-xylose. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 3467-3472.

Fernández, R.; Herrero, P.; Gascón, S.; Moreno, F. (1984). Xylose induced decrease in hexokinase PII activity confers resistance to carbon catabolite repression of invertase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Arch. Microbiol.* **139**, 139-142.

Fernández, R.; Herrero, P.; Moreno, F. (1985). Inhibition and inactivation of glucose-phosphorylating enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2705-2709.

Fernández, T.; Herrero, P.; López-Boado, Y.S.; Fernández, R.; Moreno, F. (1987). Proteolysis of hexokinase PII is not the triggering signal of carbon catabolite derepression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2509-2516.

Fiechter, A.; Fuhrmann, G.F.; Käppeli, O. (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microbiol. Phys.* **22**, 123-183.

Fiechter, A.; Sonnleitner, B. (1995). Non-invasive concepts in metabolic studies. *Adv. Microb. Physiol.* **36**, 145-180.

Flick, J.S.; Johnston, M. (1991). GRR1 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5101-5112.

Forsburg, S.L.; Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **5**, 153-180.

Fogel, S.; Welch, J.W. (1987). Yeast in biotechnology. En *Biological research on industrial yeast*. (Ed. GG Steward, J Russell, RD Klein y RR Hiebsch). pp. 99-110. CRC Press. Boca Ratón.

François, J.M.; van Schaftingen, E.; Hers, H.G. (1984). The mechanism by which glucose increases fructose-2,6-bisphosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. A cyclic-AMP-dependent activation of phosphofructokinase



## Bibliografía

---

2. Eur. J. Biochem. 145, 187-193.

**Fuge, E.K.; Braun, E.L.; Werner-Washburne, M.** (1994). Protein synthesis in long-term stationary phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 176, 5802-5813.

**Fuhrmann, G.F.; Taimor, A.; Reinhardt, C.; Martin, H.J.; Völker, B.** (1995). Modelling glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* DFY1 in different growth phases. Proc. 13<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. pp. 32. Třešt'. República Checa.

**Fuhrmann, G.F.; Völker, B.** (1992). Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 27, 1-15.

**Fuhrmann, G.F.; Völker, B.** (1993). Misuse of graphical analysis in nonlinear sugar transport kinetics by Eadie-Hofstee plots. Biochim. Biophys. Acta. 1145, 180-182.

**Furst, A.; Michels, C.A.** (1977). An evaluation of D-glucosamine as a gratuitous catabolite repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 155, 309-314.

**Galazzo, J.L.; Bailey, J.E.** (1990). Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Enz. Microb. Technol. 12, 162-172.

**Gamo, F.J.; Moreno, E.; Lagunas, R.** (1995). The low-affinity component of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* is not due to passive diffusion. Yeast. 11, 1393-1398.

**Gancedo, C.** (1971). Inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase by glucose in yeast. J. Bacteriol. 107, 401-405.

**Gancedo, C.; Gancedo, J.M.; Delgado, M.A.; Calderón, I.** (1991). Experiment A: Ethylmethane sulfonate induced mutagenesis. En FEBS Advanced Course on Biochemistry and Genetics of Yeast. Fundación Juan March. Serie Universitaria 254. Madrid.

**Gancedo, C.; Gancedo, J.M.; Sols, A.** (1968). Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilisation and production. Eur. J. Biochem. 5, 165-172.

**Gancedo, C.; Serrano, R.** (1989). Energy-yielding metabolism. En The yeasts. Vol. 3. 2ª Edición. (Ed. AH Rose y JH Harrison). pp. 205-259. Academic Press. Londres.

**Gancedo, C.; Schwerzmann, N.** (1976). Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 109, 221-225.

**Gancedo, J.M.; Clifton, D.; Fraenkel, D.G.** (1977). Yeast hexokinase mutants. J. Biol. Chem. 252, 4443-4444.

**Gancedo, J.M.; Gancedo, C.; Sols, A.** (1967). Regulation of the concentration or activity of pyruvate kinase in yeasts and its relationship to gluconeogenesis. Biochem. J. 102, 23C-25C.

**Gancedo, J.M.; Navas, M.A.** (1995). Futile cycling at gluconeogenic enzymes. Resúmenes de Control of Metabolic Flux: Metabolic Pathway Engineering in Yeasts. (European Research Conferences). p. 16. Granada.

**Garfinkel, L.; Cohen, D.M.; Soo, V.W.; Garfinkel, D.; Kulikowski, C.A.** (1989). An artificial-intelligence technique for qualitatively deriving enzyme kinetic mechanisms from initial-velocity measurements and its application to hexokinase. Biochem. J. 264, 175-184.

**Gibbs, J.B.; Marshall, M.S.** (1989). The ras oncogene-an important regulatory element in lower eucaryotic organisms. Microbiol. Rev. 53, 171-185.

**Gleeson, M.A.G.; Haas, L.O.C.; Cregg, J.M.** (1990). Isolation of *Candida tropicalis* auxotrophic mutants. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2562-2564.

## Bibliografía

---

Gonçalves, T.; Loureiro-Dias, M.C. (1991). Pitfalls in measurement of glucose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. 9<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. pp. 25. Madrid.

Gonçalves, T.; Loureiro-Dias, M.C. (1994). Aspects of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 176. 1511-1513.

González, M.I.; Stucka, R.; Blázquez, M.A.; Feldmann, H.; Gancedo, C. (1992). Molecular cloning of *CIF1*, a yeast gene necessary for growth on glucose. Yeast. 8. 183-192.

Gorbunoff, M.J. (1990). Protein chromatography on hidroxyapatite columns. En Guide to protein purification. Methods in enzymolgy. Vol. 182. (Ed. MP Deutscher). pp. 329-339. Academic Press. Nueva York.

Gottesman, S.; Maurizi, M.R. (1992). Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. Microbiol. Rev. 56. 592-621.

Grobben, N.G.; Herweijer, M.A. (1991). Do baker's yeast strains have different sugar transport characteristics as compared with laboratory strains? Proc. 9<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. pp. 33. Madrid.

Grosz, R.; Stephanopoulos, G. (1990). Physiological, biochemical and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. III. mathematical model of cellular energetics and catabolism. Biotech. Bioeng. 36. 1030-1040.

Halász, A.; Lásztity, R. (1991). Use of yeast biomass in food product. CRC Press. Cleveland.

Hartwell, L.H. (1992). Role of yeast in cancer research. Cancer. 69. 2615-2621.

Heinisch, J.J.; Arvanitidis, A.; Timpel, C. (1995). Is allosteric activation of PFK important for yeast? Resúmenes de Control of Metabolic Flux: Metabolic Pathway Engineering in Yeasts. (European Research Conferences). p. 11. Granada.

Henderson, P.J.F. (1992). Statistical analysis of enzyme kinetic data. En Enzyme assays. A practical approach. (Ed. R. Eienthal; MJ Danson). The practical approach series. pp. 277-316. Oxford University Press. Oxford.

Herbert, D.; Phipps, P.J.; Strange, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. En Methods in Microbiology. Vol. 5b. (Ed. JR Norris y DW Ribbons). pp. 210-244. Academic Press. Nueva York.

Heredia, M.F.; Heredia, C.F. (1988). *Saccharomyces cerevisiae* acquires resistance to 2-deoxiglucose at a very high frequency. J. Bacteriol. 170. 2870-2872.

Herrero, P.; Fernández, R.; Moreno, F. (1989). The hexokinase isoenzyme PII of *Saccharomyces cerevisiae* is a protein kinase. J. Gen. Microbiol. 135. 1209-1216.

Herrero, P.; Galíndez, J.; Ruiz, N.; Martínez-Campa, C.; Moreno, F. (1994). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. Yeast. 11. 137-144.

Hirai, M.; Ohtani, E.; Tanaka, A.; Fukui, S. (1977). Glucose-phophorylating enzymes of *Candida* yeasts and their regulation *in vivo*. Biochim. Biophys. Acta. 480. 357-366.

Höfer, M.; Nassar, F.R. (1987). Aerobic and anaerobic uptake of sugars in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Gen. Microbiol. 133. 2163-2172.

Hofmann, E.; Kopperschlager, G. (1982). Phosphofructokinase from yeast. En Methods in Enzymology. Vol. 90. (Ed. WA Wood). pp. 49-60. Academic Press. Nueva York.

Holzer, H. (1976). Catabolite inactivation in yeast. Trends Biochem. Sci. 1. 178-181.

## Bibliografia

---

- Hsiao, H.Y.; Chiang, L.C.; Ueng, P.P.; Tsao, G.T. (1982). Sequential utilization of mixed monosaccharides by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 43. 840-845.
- Ichii, T.; Takehara, S.; Konno, H.; Ishida, T.; Sato, H.; Suzuki, A.; Yamazaki, K. (1993). Development of a new commercial-scale airlift fermentor for rapid growth of yeast. *J. Ferment. Bioeng.* 75. 375-379.
- Jarl, K. (1969). The Symba process. *Food Technol.* 23. 23-26.
- Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Review.* 51. 458-476.
- Kalckar, H.M. (1985). The discovery of hexokinase. *TIBS.* 10. 291-293.
- Kaliterna, J.; Weusthuis, R.A.; Castrillo, J.I.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. (1995). Coordination of sucrose uptake and respiration in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology.* 141. 1567-1574.
- Keleher, C.A.; Redd, M.J.; Schultz, J.; Carlson, M.; Johnson, A.D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell.* 68. 709-719.
- Kluyver, A.J.; Custer, M.T.J. (1940). The suitability of disaccharides as respiration and assimilation substrates for yeasts which do not ferment these sugars. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 6. 121-162.
- Kogan, G.; Šandula, J.; Šimkovicová, V. (1993). Glucomannan from *Candida utilis*. Structural investigation. *Folia Microbiol.* 38. 219-224.
- Kondo, K.; Salto, T.; Kajiwar, S.; Takagi, M.; Misawa, N. (1995). A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J. Bacteriol.* 177. 7171-7177.
- Kopetzki, E.; Entian, K.D. (1985). Glucose repression and hexokinase isoenzymes in yeast. *Eur. J. Biochem.* 146. 657-662.
- Kotyk, A.; Kleinzeller, A. (1967). Affinity of the yeast membrane carrier for glucose and its role in the Pasteur effect. *Biochim. Biophys. Acta.* 135. 106-111.
- Kotyk, A.; Michaljanicová, D.; Veres, K.; Soukupova, V. (1975). Transport of 4-deoxy- and 6-deoxy-D-glucose in bakers' yeast. *Folia Microbiol.* 20. 496-503.
- Kretschmer, M.; Fraenkel, D.G. (1991). Yeast 6-phosphofructo-2-kinase. Sequence and mutant. *Biochemistry.* 30. 10663-10672.
- Kretschmer, M.; Tempest, P.; Fraenkel, D.G. (1991). Identification and cloning of yeast phosphofructokinase 2. *Eur. J. Biochem.* 197. 367-372.
- Kriegel, T.M.; Rush, J.; Vojtek, A.B.; Clifton, D.; Fraenkel, D.G. (1994). *In vivo* phosphorylation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 33. 148-152.
- Kunst, A.; Draeger, B.; Ziegenhorn, J. (1985). Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. *En Methods of enzymatic analysis.* (Ed. HU Bergmeyer). Vol. VI. pp. 178-185. VCH Publishers. Deerfield Beach.
- Lagunas, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2. 221-228.
- Lagunas, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 104. 229-242.
- Lagunas, R.; Domínguez, C.; Busturia, A.; Sáez, M.J. (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152. 19-25.

## Bibliografía

---

**Lawford, G.R.; Kligerman, A.; Williams, K.** (1979). Production of high-quality edible protein from *Candida utilis* grown in continuous culture. *Biotech. Bioeng.* 21. 1163-1174.

**Lazo, P.A.; Sols, A.** (1979). Specific inactivation of animal hexokinases by xylose *in vitro*, *in situ* and *in vivo*. *FEBS Letters*. 98. 88-90.

**Leatherbarrow, R.J.** (1990). Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends Biochem. Sci.* 15. 455-458.

**Lengeler, J.W.** (1993). Carbohydrate transport in bacteria under environmental conditions, a black box?. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63. 275-288.

**Lenz, A.G.; Holzer, H.** (1980). Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. *FEBS Lett.* 109. 271-274.

**Lenzen, S.; Freytag, S.; Panten, U.; Flatt, P.R.; Bailey, C.J.** (1990). Alloxan and ninhydrin inhibition of hexokinase from pancreatic islets and tumoral insulin-secreting cells. *Pharmacol. Toxicol.* 66. 157-162.

**Leyva, J.** (1993). Efecto de la limitación por zinc en cultivos continuos de *Candida utilis*. Tesina de Licenciatura. Madrid.

**Lichfield, J.H.** (1979). Production of single-cell protein for use in food or feed. *En. Microbial technology. Microbial processes*. Vol. 1. 2ª Edición. (Ed. HJ Peppler, D Perlman). pp. 93-157. Academic Press. Londres.

**Linardi, V.R.; Andrade, C.M.M.C.; Figueira, M.M.; Andrade, M.C.; Souza, A.A.V.** (1993). Characterization of the amylolytic system of *Candida* strains. *Folia. Microbiol.* 38. 281-284.

**López Garcés, J.** (1989). Selección de cepas de levadura para la obtención de proteína celular, a partir de subproductos de remolacha. Tesis Doctoral. Madrid.

**Loureiro-Dias, M.C.** (1988). Movements of protons coupled to glucose transport in yeast. A comparative study among 248 yeast species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 54. 331-343.

**Loureiro-Dias, M.C.; Peinado, J.M.** (1984). Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. *Biochem. J.* 222. 293-298.

**Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.** (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275.

**Ma, H.; Bloom, L.M.; Walsh, C.T.; Botstein, D.** (1989). The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9. 5643-5649.

**Magasanik, B.** (1961). Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol.* 26. 249-256.

**Maitra, P.K.** (1970). A glucokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 245. 25-30.

**Maitra, P.K.** (1975). Glucokinase from yeast. *En. Methods in Enzymology*. Vol. 42c. (Ed. WA Wood). pp. 25-31. Academic Press. Nueva York.

**Maitra, P.K.; Lobo, Z.** (1971a). A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* 246. 475-488.

**Maitra, P.K.; Lobo, Z.** (1971b). Control of glycolytic enzymes synthesis in yeast by products of the hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.* 246. 489-499.

## Bibliografía

---

- Maitra, P.K.; Lobo, Z.** (1977). Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 182. 639-645.
- Mahlberg, D.; Höfer, M.; Tauber, A.** (1985). Sugar transport and hexose-ATP-kinase activity in a 2-deoxy-D-glucose tolerant mutant of the yeast *Rhodotorula glutinis*. J. Gen. Microbiol. 131. 479-485.
- Mansure, J.J.; Silva, J.T.; Panek, A.D.** (1992). Characterization of trehalase in *Rhodotorula rubra*. Biochem Int. 28. 693-700.
- Marger, M.D.; Saier, M.H.** (1993). A major super-family of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. Trends Biochem. Sci. 18. 13-20.
- Martin, B.R.** (1987). Metabolic regulation. A molecular approach. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Martín, M.; Heredia, C.F.** (1977). Characterization of a phosphatase specific for 2-deoxyglucose-6-phosphate in a yeast mutant. FEBS Letters. 83. 245-248.
- Martínez-Campa, C.; Herrero, P.; Ramírez, M.; Moreno, F.** (1996). Molecular analysis of the promoter region of the hexokinase 2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 137. 69-74.
- Matsumoto, K.; Uno, I.; Ishikawa, T.** (1985). Genetic analysis of the role of cAMP in yeast. Yeast. 1. 15-24.
- Matsumoto, K.; Uno, I.; Ishikawa, T.; Oshima, Y.** (1983). Cyclic AMP may be not involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants unable to synthesize it. J. Bacteriol. 156. 898-900.
- Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.** (1977). Hexose kinases from *Rhodotorula glutinis*. Arch. Biochem. Biophys. 167. 452-457.
- Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.** (1982). Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *In vivo* phosphorylation of the enzyme. J. Biol. Chem. 257. 1128-1130.
- Mc Cann, K.; Hilberg, F.; Kenworthy, P.; Barnett, J.A.** (1987). An unusual hexose-ATP-kinase with two catalytic sites and a role in carbon catabolite repression in the yeast *Schwanniomyces occidentalis*. J. Gen. Microbiol. 133. 381-389.
- Mc Goldrich, E.M.; Wheal, A.E.** (1989). Controlling the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* cells using the glucose analogue D-glucosamine. J. Gen. Microbiol. 135. 2407-2411.
- Mertens, E.; Müller, M.** (1990). Glucokinase and fructokinase of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. J. Protozool. 37. 384-388.
- Michels, C.A.; Romanowski, A.** (1980). Pleiotropic glucose repression-resistant mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 143. 674-679.
- Milbradt, B.; Höfer, M.** (1990). Isolation and characterization of a *Rhodotorula glutinis* mutant defective in glucose transport. J. Gen. Microbiol. 136. 1961-1965.
- Monod, J.** (1950). La technique de culture continue. Théorie et application. Ann. Inst. Pasteur. 79. 390-410.
- Montenecourt, B.S.; Kuo, S.C.; Lampen, J.O.** (1973). *Saccharomyces* mutants with invertase formation resistant to repression by hexoses. J. Bacteriol. 114. 233-238.
- Moore, P.A.; Sagliocco, F.A.; Wood, R.M.C.; Brown, A.J.P.** (1991). Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. Mol. Cell. Biol. 11. 5330-5337.
- Moreno, F.; Fernández, T.; Fernández, R.; Herrero, P.** (1986). Hexokinase PII from *Saccharomyces cerevisiae*

## Bibliografía

---

- is regulated by changes in the cytosolic  $Mg^{2+}$ -free ATP concentration. *Eur. J. Biochem.* **161**, 565-569.
- Müller, S.; Boles, E.; Zimmermann, F.K. (1995). Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**, 4517-4519.
- Müller, D.; Holzer, H. (1981). Regulation of fructose-1,6- bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 926-933.
- Navas, M.A.; Cerdán, S.; Gancedo, J.M. (1993). Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 1290-1294.
- Navas, M.A.; Gancedo, J.M. (1996). The regulatory characteristics of yeast fructose-1,6-bisphosphatase confers only a small selective advantage. *J. Bacteriol.* **178**, 1809-1812.
- Nehlin, J.O.; Carlberg, M.; Ronne, H. (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* **10**, 3373-3377.
- Nehlin, J.O.; Ronne, H. (1990). Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger protein. *EMBO J.* **9**, 2891-2898.
- Nielsen, J.; Nikolajsen, K.; Villadsen, J. (1991). Structured modeling of a microbial system: I. A theoretical study of lactic acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1-10.
- Nielsen J.; Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chem. Eng. Sci.* **47**, 4225-4270.
- Novak, S.; D'Amore, T.; Stewart, G.G. (1990). 2-deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. *FEBS Letters.* **269**, 202-204.
- Oehlen, L.J.W.M.; Scholte, M.E.; de Koning, W.; van Dam, K. (1994). Decrease in glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* cdc35-1 cells at restrictive temperature correlates with a decrease in glucose transport. *Microbiology.* **140**, 1891-1898.
- Opekarová, M.; Tanner, W. (1994). An *in vitro* study of the effect of nystatin on permeases of eukaryotic cells. *Folia Microbiol.* **39**, 538.
- Osinga, K.A.; Beudeker, R.F.; van der Plaat, J.B.; de Hollander, J.A. (1988). Patente Europea 0 306 107.
- Osinga, K.A.; Renniers, A.C.H.M.; Welbergen, J.W.; Roobol, R.B.; van der Wilde, N. (1989). Maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **5** (suplemento), 207-212.
- Oura, E. (1977). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem.* **12**, 19-35.
- Özcan, S.; Freidel, K.; Leukel, A.; Ciriacy, M. (1993). Glucose uptake and catabolite repression in dominant HTR1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**, 5520-5528.
- Özcan, S.; Johnston, M. (1995). The different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1564-1572.
- Özcan, S.; Schulte, F.; Friedel, K.; Weber, A.; Ciriacy, M. (1994). Glucose uptake and metabolism in *grr1/cat80* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **224**, 605-611.
- Pirt, S.J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Páca, J.; Grégr, V. (1979). Effect of  $PO_2$  on growth and physiological characteristics of *Candida utilis* in a multistag tower fermentor. *Biotech. Bioeng.* **21**, 1827-1843.

## Bibliografía

---

- Peinado, J.M.; Barbero, A.; Nombela, C. (1987b). Starch biodegradation by yeasts: glucose effects on the utilization of other ends products of starch hydrolysis. Proc. 4<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology. (Ed. OM Neijssel, RR van der Meer y KChAM Luyben). pp. 528-530.
- Peinado, J.M.; Barbero, A.; van Uden, N. (1987a). Repression and inactivation by glucose of the maltose transport system of *Candida utilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 154-157.
- Peinado, J.M.; Cameira-Dos-Santos, P.J.; Loureiro-Días, M.C. (1989). Regulation of glucose transport in *Candida utilis*. J. Gen. Microbiol. 135, 195-201.
- Peinado, J.M.; Loureiro-Dias, M.C. (1986). Reversible loss of affinity induced by glucose in the maltose-H<sup>+</sup> symport of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 856, 189-192.
- Perea, J.; Gancedo, C. (1978). Glucose transport in a glucosephosphate isomeraseless mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Microbiol. 1, 209-211.
- Petrik, M.; Käppeli, O.; Fiechter, A. (1983). An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation. J. Gen. Microbiol. 129, 43-49.
- Postma, E.; Kuiper, A.; Tomasouw, W.F.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1989a). Competition for glucose between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 3214-3220.
- Postma, E.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1988). Adaptation of the kinetics of glucose transport to environmental conditions in the yeast *Candida utilis* CBS 621: a continuous-culture study. J. Gen. Microbiol. 134, 1109-1116.
- Postma, E.; Verduyn, C.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1989b). Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 468-477.
- Prior, C.; Mamessier, P.; Fukuhara, H.; Chen, X.J.; Wésolowski-Louvel, M. (1993). The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene RAG1 in *Kluyveromyces lactis*. Mol. Cell. Biol. 13, 3882-3889.
- Proft, M.; Kötter, P.; Hedges, D.; Bojunga, N.; Entian, K.D. (1995). CAT5, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14, 6116-6126.
- Puri, R.N.; Roskoski, R.J. (1994). Inactivation of yeast hexokinase by Cibacron Blue 3G-A: spectral, kinetic and structural investigations. Biochem. J. 300, 91-97.
- Rández-Gil, F.; Prieto, J.A.; Sanz, P. (1995). The expression of a specific 2-deoxyglucose-6P phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast. Current Genetics. 28, 101-107.
- Reibstein, D.; den Hollander, J.A.; Pilkis, S.J.; Shulman, R.G. (1986). Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: its role in aerobic and anaerobic glycolysis. Biochemistry. 25, 219-227.
- Reifenberger, E.; Freidel, K.; Ciriacy, M. (1995). Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. Mol. Microbiol. 16, 157-167.
- Reinhardt, C.; Völker, B.; Martin, H.J.; Fuhrmann, G.F. (1995). Temperature dependence of glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* DFY1 in different growth phases. Proc. 13<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. pp. 36. Třešt'. República Checa.
- Reed, G.; Nagodawithana, T.W. (1991). Yeast technology. 2<sup>a</sup> ed. van Nostrand Reinhold Publications. Nueva York.
- Reiser, C.O. (1954). *Torula* yeast from potato starch wastes. Agr. Food Chem. 2, 70-75.

## Bibliografía

---

- Renger, R. (1991). Carbon dioxide and its relevance to large-scale brewery fermentation. Tesis Doctoral. Delft.
- Riballo, E.; Herweijer, M.; Wolf, D.H.; Lagunas, R. (1995). Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177, 5622-5627.
- Richard, P.; Diderich, J.A.; Bakker, B.M.; Teusink, B.; van Dam, K.; Westerhoff, H.V. (1994). Yeast with a specific cellular make-up and an environment that removes acetaldehyde are prone to sustained glycolytic oscillations. *FEBS Letters*, 341, 223-226.
- Rieger, M.; Käppeli, O.; Fiechter, A. (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 653-661.
- Rizzi, M.; Theobald, U.; Baltes, M.; Reuss, M. (1993). Measurements and modelling of the dynamic glucose response of *Saccharomyces cerevisiae* in the time window of mixing times. *En Bioreactor and bioprocess fluid dynamics*. (Ed. AW Nienow). pp. 401-412. Mechanical Engineering Publications. Londres.
- Rizzi, M.; Theobald, U.; Querfurth, E.; Rohrhirsch, T.; Baltes, M.; Reuss, M. (1996). *In vivo* investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* 49, 316-327.
- Romano, A.H. (1982). Facilitated diffusion of 6-deoxy-D-glucose in bakers' yeast: evidence against phosphorylation-associated transport of glucose. *J. Bacteriol.* 152, 1295-1297.
- Rose, M.; Albig, W.; Entian, K.D. (1991). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase PI and PII. *Eur. J. Biochem.* 199, 511-518.
- Rose, M.; Entian, K.D.; Hofmann, L.; Vogel, R.F. (1988). Irreversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphatase independent of protein phosphorylation at Ser11. *FEBS Lett.* 241, 55-59.
- Sá Correia, I. (1984). Bioconversão de amido e inulina per leveduras. Produção de biomassa e etanol. Tesis Doctoral. Lisboa.
- Sanz, P.; Rández-Gil, F.; Prieto, J.A. (1994). Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxiglucose resistance in yeast. *Yeast*, 10, 1195-1202.
- Schaaff, I.; Heinisch, J.; Zimmermann, F.K. (1989). Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*, 5, 285-290.
- Schork, S.M.; Thumm, M.; Wolf, D.H. (1995). Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 26446-26450.
- Schuddemat, J.; van den Broek, P.J.A.; van Steveninck, J. (1988). The influence of ATP on sugar uptake mediated by the constitutive glucose carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 937, 81-87.
- Schulz, B.; Höfer, M. (1986). Utilization of lactose in non-respiring cells of the yeast *Debaryomyces polymorphus*. *Arch. Microbiol.* 145, 367-371.
- Schwartzkoff, C.L.; Rogers, P.L. (1982). Glycogen synthesis by glucose-limited *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1635-1638.
- Seminarios del Comité de la Industria Química, de la Comisión para Europa de la ONU. (1986). Informe CHEM/SEM.15/R.16. The production of fodder yeast from crude-oil distillate at VEB Petrolchemisches Kombinat Schwedt.
- Seminarios del Comité de la Industria Química, de la Comisión para Europa de la ONU. (1986). Informe CHEM/SEM.15/R.30. A system for biochemical reactions under aseptic conditions with minimum consumption of electric energy.



## Bibliografía

---

- Sen A.K.; Widdas, W.F. (1962). Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane by glucose exit. *J. Physiol.* 160. 392-403.
- Serrano, R.; De la Fuente, G. (1974). Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5. 161-171.
- Sierkstra, L.N.; Nouwen, N.P.; Verbakel, J.M.A.; Verrips, C.T. (1993). Regulation of glycolytic enzymes and the Crabtree affect in galactose limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. ver número.
- Sierkstra, L.N.; ter Schure, E.G.; Verbakel, J.M.A.; Verrips, C.T. (1994). A nitrogen-limited, glucose-repressed, continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 140. 593-599.
- Sierkstra, L.N.; Verbakel, J.M.A.; Verrips, C.T. (1992). Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138. 2559-2566.
- Sims, A.P.; Barnett, J.A. (1991). Levels of activity of enzymes involved in anaerobic utilization of sugars by six yeast species: observations towards understanding the Kluyver effect. *FEMS Microbiol. Lett.* 77. 295-298.
- Sims, A.P.; Kopetzki, E.; Schulz, B.; Barnett, J.A. (1984). The use of phenolic glycosides for studying the aerobic or anaerobic transport of disaccharides into yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 130. 1933-1940.
- Sims, A.P.; Ståhlbrand, H.; Barnett, J.A. (1991). The role of pyruvate decarboxylase in the Kluyver effect in the food yeast, *Candida utilis*. *Yeast*. 7. 479-487.
- Snoep, J.L.; Yomano, L.P.; Westerhoff, H.V.; Ingram, L.O. (1995). Protein burden in *Zymomonas mobilis*: negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. *Microbiology*. 141. 2329-2337.
- Sokolov, D.M.; Sharyshev, A.A.; Finogenova, T.V. (1995). Subcellular location of enzymes mediating metabolism in various groups of yeasts. *Biochemistry-Moscow*. 60. 1325-1331.
- Sols, A. (1967). Regulation of carbohydrate transport in yeast. *En. Aspects of yeast metabolism*. (Ed. AK Mills y H Krebs). pp. 47-66. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Sonnleitner, B.; Käppel, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotech. Bioeng.* 28. 927-937.
- Sonnleitner, B.; Hahnemann, U. (1994). Dynamics of the respiratory bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 38. 63-79.
- Sousa-Dias, S.; Gonçalves, T.; Leyva, J.S.; Peinado, J.M.; Loureiro-Dias, M.C. (1996). Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*. aceptado para su publicación.
- Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M. (1988). Yeast Genetic. *En. Yeast: A practical approach*. (Ed. I Campbell y JH Duffus). pp. 65-106. IRL-Press. Oxford.
- Spencer-Martins, I.; van Uden, N. (1985). Catabolite interconversion of glucose transport systems in the yeast *Candida wickerhamii*. *Biochim. Biophys. Acta*. 812. 168-172.
- Steinböck, F.; Choojun, S.; Held, I.; Roehr, M.; Kubicek, C.P. (1994). Characterization and regulatory properties of a single hexokinase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1200. 215-223.
- Theobald, U.; Mailinger, W.; Reuss, M.; Rizzi, M. (1993). *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotides pool applying a rapid sampling technique. *Anal. Biochem.* 214. 31-37.

## Bibliografía

---

- Theodoris, G.; Fong, N.M.; Coons, D.M.; Bisson, L.F.** (1994). High-copy suppression of glucose transport defects by HXT4 and regulatory elements in the promoters of the HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 137. 957-966.
- Thevelein, J.M.** (1991). Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 5. 1301-1307.
- Thevelein, J.M.** (1992). The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 62. 109-130.
- Thevelein, J.M.** (1994). Signal transduction in yeast. 10. 1753-1790.
- Thevelein, J.M.; Hohmann, S.** (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* 20. 3-10.
- Torres, J.C.; Guixé, V.; Babul, J.** (1995). A new method of assessing rates of the futile cycle during glycolytic and gluconeogenic metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 321. 517-528.
- Trivadi, N.B.; Jackson, G.K.; Tesch, W.** (1986). Bakers' yeast. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 24. 75-106.
- Trumbly, R.S.** (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6. 15-21.
- Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; Stauffer, J.F.** (1972). *Manometric and biochemical techniques*. 5ª Edición. pp. 30-47. Burgess Publishing Company. Minneapolis..
- van den Broek, P.J.A.; De Bruijne, A.W.; van Steveninck, J.** (1987). The role of ATP in the control of H<sup>+</sup>-galactoside symport in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. J.* 242. 729-734.
- van den Broek, P.J.A.; van Gompel, A.E.; Luttkik, M.A.H.** (1995). Characterization of glucose and maltose transport in plasma membrane vesicles from *Candida utilis*. *Proc. 13<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*. pp. 39. Třešt'. República Checa.
- van der Aar, P.C.; van Verseveld, H.W.; Stouthamer, A.H.** (1990). Stimulated glycolytic flux increases the oxygen uptake rate and the aerobic ethanol production, during oxidoreductive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 13. 347-359.
- van der Platt, J.B.** (1974). Cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate stimulates degradation in bakers' yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56. 580-587.
- van Dijck, P.; Colavizza, D.; Smet, P.; Thevelein, J.M.** (1994). Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 61. 109-115.
- van Dijken, J.P.; Scheffers, W.A.** (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32. 199-224.
- van Iersel, M.F.M.; Rombouts, F.M.; Abee, T.** (1995). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at low temperature. *En Microbial Physiology and gene regulation: Emerging principles and applications. Beijerinck Centennial*. (Ed. WA Scheffers y JP van Dijken). pp. 388-389. Delft University Press. La Haya. Holanda.
- van Uden, N.** (1967). Transport-limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and its competitive inhibition. *Arch. Microbiol.* 58. 155-168.
- van Uden, N.** (1971). Kinetics and energetics of yeast growth. *En. The Yeast*. Vol. 2. 1ª Edición. (Ed. AH Rose y JS Harrison). pp. 75-119. Academic Press. Londres.

## Bibliografía

---

- van Uden, N. (1989). Effects of alcohols on membrane transport in yeasts. *En Alcohol toxicity in yeasts and bacteria*. (Ed. N. van Uden). pp. 135-146. CRC Press. Boca Ratón.
- van Urk, H.; Postma, E.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1989). Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 135. 2399-2406.
- Vanoni, M.; Sollitti, P.; Goldenthal, M.; Marmur, J. (1989). Structure and regulation of the multigene family controlling maltose fermentation in budding yeast. *Prog. Nucl. Acid. Res.* 37. 281-322.
- Veramp, E.; Backman, V.M.; Bjornsson, J.M.; Soll, D.; Eggertsson, G. (1993). The periplasmic dipeptide permease system transports 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175. 1452-1456.
- Verduyn, C. (1991). Physiology of yeasts in relation to growth yields. *Antonie van Leeuwenhoek. Número especial Growth and metabolism of microorganism.* 60. 325-353.
- Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* 8. 501-517.
- Verduyn, C.; Stouthamer, A.H.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* 59. 49-63.
- Villar, A.L. (1992). Sensibilidad a etanol en levaduras: Bases fisiológicas y análisis de métodos empleados en su determinación. Tesis Doctoral. Madrid.
- Visser, W. (1995). Oxygen requirements of fermentative yeasts. Tesis Doctoral. Delft. Holanda.
- Visser, W.; Scheffers, W.A.; Batenburg-van der Vegte, W.H.; van Dijken, J.P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56. 3784-3792.
- Vojtek, A.B.; Fraenkel, D.G. (1990). Phosphorylation of yeast hexokinases. *Eur. J. Biochem.* 190. 371-375.
- Völker, B.; Pinnel, S.; Martin, H.J.; Fuhrmann, G.F. (1995). Glucose transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. 13<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics.* pp. 38. Třešť. República Checa.
- von Stockar, U.; Auberson, L.C.M. (1992). Chemostat cultures of yeasts, continuous culture fundamentals and simple unstructured mathematical models. *J. Biotechnol.* 22. 69-88.
- Vraná, D.; Panos, J.; Votruba, J. (1989) Production of ethanol by the yeast *Candida utilis* under autoanaerobic conditions. *Folia Microbiol.* 34. 542-544.
- Vraná, J. (1960). Utilization of the spent sulfite liquor in the Ružomberok cellulose production factory. *Paper Cellul.* 15. 74-77.
- Walsh, M.C.; Smits, H.P.; Scholte, M.; van Dam, K. (1994a). Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.* 176. 953-958.
- Walsh, M.C.; Smits, H.P.; van Dam, K. (1994b). Respiratory inhibitors affect incorporation of glucose into *Saccharomyces cerevisiae* cells, but not the activity of glucose transport. *Yeast.* 10. 1553-1558.
- Walsh, M.C.; Smits, H.P.; van Dam, K. (1994c). Rapid kinetics of glucose transport uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. 12<sup>th</sup> Small Meeting on Yeast Transport and Energetics.* pp. 67-68. Karpacz. Polonia.
- Wang, J.; Suzuki, N.; Kataoka, T. (1992). The 70-Kilodalton adenylyl cyclase-associated protein is not essential for interaction of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase with RAS proteins. *Mol. Cell. Biol.* 12. 4937-4945.
- Wang, J.; Suzuki, N.; Nishida, Y.; Kataoka, T. (1993). Analysis of the function of the 70-kilodalton cyclase-

## Bibliografía

---

associated protein (CAP) by using mutants of yeast adenyl cyclase defective in CAP binding. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4087-4097.

Wedlock, D.N.; James, A.P.; Thornton, R.S. (1989). Glucose-negative mutants of *Pachysolen tannophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2019-2026.

Wedlock, D.N.; Thornton, R.S. (1989). A hexokinase associated with catabolite repression in *Pachysolen tannophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2013-2018.

Weusthuis, R.A. (1994). Disaccharide fermentation by yeasts. Tesis Doctoral. Universidad Tecnológica de Delft.

Weusthuis, R.A.; Adams, H.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1993). Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3102-3109.

Weusthuis, R.A.; Luttik, M.A.H.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. (1994a). Is the Kluyver effect in yeast caused by product inhibition? *Microbiology*. **140**, 1723-1729.

Weusthuis, R.A.; Pronk, J.T.; van den Broek, P.J.A.; van Dijken, J.P. (1994b). Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Reviews*. **58**, 616-630.

Weusthuis, R.A.; Visser, W.; Pronk, J.T.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P. (1994c). Effects of oxygen on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology*. **140**, 703-715.

Wilson, R.B.; Renault, G.; Jacquet, M.; Tatchell, K. (1993). The *pde2* gene of *saccharomyces cerevisiae* is allelic to *rca1* and encodes a phosphodiesterase which protects the cells from extracellular cAMP. *FEBS Lett.* **325**, 191-195.

Woolfitt, A.R.; Kellett, G.T.; Hoggett, J.G. (1988). Synergistic binding of glucose and aluminium-ATP to hexokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta*. **955**, 346-351.

Wrede, C.; Völker, B.; Kuntzel, H.; Fuhrmann, G.F. (1992). Kinetic analysis of glucose transport in wild-type and transporter deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains under glucose repression and derepression. *J. Biotechnol.* **27**, 47-57.

Zwietering, M.H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F.M.; van't Riek, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875-1881.